

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**POTENCIAL CODIFICANTE Y DISECCIÓN
FUNCIONAL DE GENES DE HORMONAS DEL
CRECIMIENTO HIPOFISIARIAS DE PRIMATES**

Tesis realizada por:

Bioq. Mauricio Andrés Salinas Santander

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con orientación terminal en
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

Julio 2008

ÍNDICE GENERAL	Pág.
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hormona del crecimiento	1
1.1.1.- Historia de la hormona de crecimiento (GH)	2
1.2.- Las familia génica de la (GH)	3
1.3.- Evolución de la GH: de mamíferos a antropoides	3
1.4.- Estructura y Función	5
1.4.1.- Estructura del locus GH en humanos	5
1.4.2.- Estructura del <i>loci</i> GH en primates	8
1.4.3.- Funciones de la familia GH	9
A.- GH hipofisiaria (GH-N)	9
B.- GH placentaria (GH-V)	10
C.- CSH	10
1.4.4.- Mecanismo de acción de la GH-N	11
1.5.-Modelos de estudio para GH	14
1.5.1.-Modelo de diferenciación adiposa	14
1.5.2.-Modelo lactogénico	16
CAPÍTULO II: ANTECEDENTES	17
CAPÍTULO III: JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	19
CAPÍTULO IV: OBJETIVO	22
4.1.- Objetivo general	22
4.2.- Objetivos específicos	23

CAPITULO V: MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1.- Material	23
A. Material biológico y vectores de clonación	23
B. Reactivos químicos y enzimáticos	23
C. Cultivo celular	24
D. Equipos e infraestructura	24
5.2.- Métodos	26
5.2.1.- Estrategia experimental	26
5.2.2.- Técnicas de laboratorio	27
5.2.2.a.- Análisis bioinformático	27
5.2.2.b.- Producción de vectores a pequeña y mediana escalas	29
5.2.2.c.-Análisis de clonas recombinantes	30
5.2.2.c.1.-Extracción de DNA plasmídico	30
5.2.2.c.2.- Selección de las clonas recombinantes	31
5.2.2.d.- Subclonación de unidades transcripcionales: Construcción de plásmidos	31
5.2.2.d.1.- Subclonación directa	31
5.2.2.d2.- Subclonación mediante PCR	34
5.2.2.e.- Cultivo celular y ensayos de transfección	36
5.2.2.f.- Determinación de variantes de los RNAm	37
5.2.2.f.1.- RT-PCR	37
5.2.2.f.2.- Hibridación tipo Northern	38
5.2.2.f.3.- Diseño de sonda	38
5.2.2.g.- Determinación de isoformas protéicas	39
A) Inmunodetección tipo Western	39
B) Ensayo de desglicosilación	40
5.2.2.h.- Ensayos de actividad biológica	40
A) Conversión adiposa	40
B) Proliferación	42
CAPÍTULO VI: RESULTADOS	44

6.1.- Análisis bioinformático	44
A.- Genes	44
B.- RNA mensajeros	45
C.- Proteínas	51
D.- Plásmidos recombinantes	56
6.2.- Subclonación de unidades transcripcionales (UT) de los genes de las GHs	58
A.- Obtención de las UT y su posterior subclonación: casos del humano, lémur y Chimpancé	58
B.- Los casos restantes de las UT de las GHs de interés	61
6.3.- Caracterización de vectores recombinantes	64
6.4.- Ensayos de transfección	65
A.- Estandarización de las transfección	65
B.- Transfección de GHN Recombinantes	66
B.1.- Determinación de GH mediante RIA a partir de sobrenadantes	67
C.- Determinación de isoformas de GH mediante Western blot	68
C.1.- Ensayo de desglicosilación	69
D.-Determinación de variantes de RNAm	70
D.1.- RT-PCR	70
D.2.- Hibridación tipo Northern	72
A.- Obtención de sonda	72
B.- Detección de RNAm mediante hibridación tipo Northern	73
6.5.- Ensayos de actividad biológica	75
A.- Conversión adiposa	75
B.- RT-PCR semicuantitativa de marcadores moleculares de Diferenciación adiposa	77
B.1.- Extracción de RNA total de células 3T3L1	77
B.2.- RT-PCR semicuantitativa PPAR γ , LPL y 36B4	77
• Estandarización para eferencia 36B4	77

a.-Temperatura óptima de amplificación	78
b.- Número de ciclos de amplificación	78
c.- Cantidad de DNAc	79
• Estandarización para PPAR γ y LPL	80
a.-Temperatura	80
b.- Ciclos	82
• Resultados RT-PCR semicuantitativa de marcadores moleculares de diferenciación adiposa	83
C.- Proliferación celular	86
 CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN	 88
7.1 Subclonación molecular de GHs hipofisiarias	88
7.2 Potencial transcripcional de GHs hipofisiarias	89
7.3 Potencial traduccional de GHs	91
7.4 Actividad biológica comparativa de las GHs	93
 CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES	 97
 CAPÍTULO IX: BIBLIOGRAFÍA	 99
 CAPÍTULO X: ANEXOS	 105

ÍNDICE DE FIGURAS		Pág.
Figura 1	Principales miembros de la superfamilia de proteínas somatolactógenas.	2
Figura 2	Similitud de los genes del <i>locus</i> GH humano.	3
Figura 3	Reemplazo de aminoácidos en la posición 171 de la GH y en la posición 43 del GHR.	5
Figura 4	El <i>locus</i> GH humano	6
Figura 5	Elementos involucrados en la regulación de la expresión de los integrantes del locus GH/CSH.	7
Figura 6	Esquema general de acción de la hGH.	10
Figura 7	Perfiles de expresión de hormonas HGH-N, HGH-V y HCSH durante el embarazo	11
Figura 8	Interacción de hGH con hGHR.	12
Figura 9	Mecanismo molecular de acción de la GH.	13
Figura 10	Interacción de hGH con el receptor PRLR.	14
Figura 11	Organización de los <i>loci</i> GH en primates.	20
Figura 12	Análisis ontogénico en un <i>locus</i> específico de GH.	21
Figura 13	Análisis filogénico de un gen del <i>locus</i> GH a lo largo de la evolución de <i>loci</i> representativos de primates.	21
Figura 14	Estrategia experimental empleada.	28
Figura 15	Estrategia de clonación de la unidad transcripcional (UT) de hGH en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro+.	32
Figura 16	Estrategia de clonación de la UT de GH-N del Lémur en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro+.	33
Figura 17	Estrategia de clonación de la UT de GH-N del chimpancé en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro+.	34
Figura 18	Amplificación por PCR de UT de GH.	35

Figura 19	Estrategia general de clonación de la UT de GH-N en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro+.	36
Figura 20	Obtención por PCR de sonda para Northern Blot.	39
Figura 21	Similitud entre secuencias génicas de GHs.	45
Figura 22	Comparación entre secuencias génicas de GHs.	46
Figura 23	Similitud entre secuencias de RNAm de GHs.	47
Figura 24	Comparación entre especies de RNAm principales de GHs.	49-50
Figura 25	Similitud entre polipéptidos GHs.	51
Figura 26	Comparación de secuencias aminoácidas de GHs de diferentes especies de vertebrados.	52
Figura 27	Estructura tridimensional de la hGH.	53
Figura 28	Phe ⁴⁴ presente en GHs de simios.	54
Figura 29	DNA de plásmidos Topo TA y Topo XL portadores de genes GHs.	56
Figura 30	Caracterización de los plásmidos Topo TA y Topo XL portadores de genes GHs con <i>Pst</i> I.	57
Figura 31	Caracterización de los plásmidos Topo TA y Topo XL portadores de GHs con <i>Eco</i> R1.	57
Figura 32	Análisis virtual de los plásmidos TopoTA-hGH y TopoXL-GH-N Lémur.	58
Figura 33	Subclonación de las UT de los genes de las GHs del humano y lémur.	59
Figura 34	Análisis virtual de vector TopoXL-GHN Chimpancé.	60
Figura 35	Subclonación de la UT de GH-N del chimpancé.	61
Figura 36	Amplificación de las UTs de GH-N correspondientes a gorila, mono araña y mono rhesus.	62
Figura 37	Subclonación de las UTs de las GHs del gorila, mono araña y	63

mono rhesus.

Figura 38	DNA plasmidial de vectores recombinantes pcDNA3.1H+ portadores de GHs.	64
Figura 39	Caracterización de vectores recombinantes pcDNA3.1H+ portadores de las UT de las GHs, con las enzimas de restricción <i>Pst</i> I y <i>Kpn</i> I + <i>Eco</i> RV.	65
Figura 40	Producción de hGH en células HeLa transfectadas con el vector de expresión de la hGH-N.	66
Figura 41	Producción de GHs en células HeLa transfectadas con vectores de expresión de las GHs de interés.	67
Figura 42	Western blot de muestras del medio de células HeLa transfectadas.	68
Figura 43	Western blot de muestras sometidas al ensayo de desglicosilación.	70
Figura 44	Electroforesis de RNA obtenido de células HeLa transfectadas.	71
Figura 45	Amplificación por PCR de los DNAs de los RNAs de GHs analizadas en este trabajo.	72
Figura 46	Amplificación por PCR de la sonda para la hibridación tipo Northern.	73
Figura 47	Electroforesis de RNA para detección de mensajeros por hibridación tipo Northern.	74
Figura 48	Autorradiografía de hibridación tipo Northern.	74
Figura 49	Inducción de diferenciación adiposa en células 3T3L1 tratadas con GHs obtenidas de transfección.	76
Figura 50	Electroforesis de RNA obtenido de células 3T3L1.	77
Figura 51	Curva de temperatura para amplificación por PCR del gen de referencia 36B4.	78
Figura 52	Curva de ciclos para amplificación por PCR del gen de referencia 36B4.	79
Figura 53	Curva de concentración DNAs para amplificación por PCR del gen de referencia 36B4.	80

Figura 54	Curva de temperatura para amplificación por PCR del marcador de diferenciación PPAR γ .	81
Figura 55	Curva de temperatura para amplificación por PCR del marcador de diferenciación LPL.	81
Figura 56	Curva de ciclos para amplificación por PCR del marcador de diferenciación PPAR γ .	82
Figura 57	Curva de ciclos para amplificación por PCR del marcador de diferenciación LPL.	83
Figura 58	Marcadores moleculares de diferenciación adiposa.	84
Figura 59	Grafica análisis densitométrico marcadores moleculares de diferenciación adiposa en células 3T3L1 por tratamiento con GHs.	85
Figura 60	Proliferación celular inducida en células Nb2 por tratamiento con GHs.	87

ÍNDICE DE CUADROS	Pág.
Cuadro 1 Análisis comparativo y funcional de genes GH de primates.	21
Cuadro 2 Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de diferentes GHs.	35
Cuadro 3 Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de los cDNAs correspondientes a las diferentes GHs analizadas.	37
Cuadro 4 Programas empleados en la amplificación por PCR de los cDNAs correspondientes a las GHN analizadas en este trabajo.	37
Cuadro 5 Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de los marcadores de diferenciación adiposa.	42
Cuadro 6 Programas empleados en la amplificación por PCR de los marcadores de diferenciación adiposa.	42
Cuadro 7 Resultados de la comparación de las secuencias génicas de GHs.	44
Cuadro 8 Especies de mensajeros descritos para hGH-N.	47
Cuadro 9 Comparativa del grado de similitud entre transcritos primarios y RNAm maduros.	48
Cuadro 10 Divergencia de GHs en sitios funcionalmente importantes	55
Cuadro 11 Resultados de los análisis comparativos de las unidades transcripcionales de las GHs estudiadas.	98

ABREVIATURAS

Arg	Aminoácido arginina
Asn	Aminoácido asparragina
bGH	Hormona de crecimiento bovina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Grados centígrados (grados Celsius)
Cols.	Colaboradores
CSH	Somatomamotropina coriónica
CSHR	Receptor de somatomamotropina coriónica
Cys	Aminoácido cisteína
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dubelco.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
DO	Densidad óptica
FBS	Suero bovino fetal
g	Gramos
GH	Hormona de crecimiento
GHc	Hormona de crecimiento comercial
GH-N	Hormona de crecimiento normal o hipofisiaria
GHR	Receptor de hormona de crecimiento
GH-V	Hormona de crecimiento variante
GM	Grandes monos
His	Aminoácido histidina
HGH-N	Proteína GH humana
hGH-N	Gen de hormona de crecimiento hipofisiaria
HGH-R	Receptor de GH, la proteína
hGH-R	Gen del receptor de GH
hPRLc	Prolactina humana comercial
kDa	Kilo Daltones
HS	Suero de caballo
L	Litro
LB	Medio de Luria-bertani
Leu	Aminoácido leucina
LPL	Lipoproteínlipasa
m	Mili
min	Minutos
M	Concentración molar
MD	Medio definitivo
MNM	Monos del nuevo mundo
MVM	Monos del viejo mundo
n	Nano
nm	Nanómetros
OPTI-MEM	Medio reducido en suero modificado de Eagle.
PAGE	Gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Phe	Aminoácido fenilalanina
PL	Lactógeno placentario o somatomamotropina coriónica
PLF	Proliferina
PLP	Proteína semejante a prolactina
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
PRP	Proteínas relacionadas a prolactina
p/v	Peso-volumen
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
seg	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SL	Somatolactina
TE	Amortiguador Tris- EDTA
UT	Unidad transcripcional
μ	Micro

RESUMEN

Bioq. Mauricio Andrés Salinas Santander

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Potencial codificante y disección funcional de genes de hormonas del crecimiento hipofisiarias de primates.

El *locus* de la hormona del crecimiento humano (GH) está constituido por cinco genes: 5'<GH-1/CSHL-1/CSH-2/GH-2/CSH-3>3', ubicados en el cromosoma 17q24.2. Estudios realizados por nuestro grupo en el campo de la genómica comparativa, han revelando que en primates éste locus experimentó una acelerada evolución, reteniendo el primer gen del loci (GH hipofisiaria). No se tiene claro si este miembro de los *loci* comparte el mismo potencial codificante y funcional, o si a lo largo de la evolución se ha especializado, delegando funciones a los otros genes de sus respectivos *locus*.

El objetivo del presente estudio fue comparar el potencial codificante y funcional de los genes de GHs hipofisiarias (GH-N), a lo largo de la evolución de los *loci* de grupos de prosimios, simios (MNM, MVM y grandes monos) y del humano. Para ello se clonaron las unidades transcripcionales de los genes de GH-N de seis especies representativas a lo largo de la escala evolutiva de primates (lémur, mono araña, mono rhesus, gorila, chimpancé y humano), en el vector de expresión para células eucariotas pcDNA3.1/hygro(+). Los vectores generados fueron transfectados mediante lipofección en células HeLa. Después de 72 horas se recuperó el medio de cultivo para realizar la detección de GH en sobrenadantes mediante RIA y Western Blot. A las pastillas celulares se les realizó extracción de RNA total para detectar mensajeros de GH mediante RT-PCR y Northern Blot. Los sobrenadantes fueron empleados en ensayos de actividad biológica, en los cuales se determinó el potencial de diferenciación, mediante la conversión adipocítica experimentada por preadipocitos 3T3L1, y lactogénico mediante proliferación en la línea celular Nb2 derivada de linfoma de rata.

Se generaron seis vectores de expresión para cada gen GH-N de cada una de las especies seleccionadas. A partir de los ensayos de transfección con los vectores pcDNA3.1GH-N en la línea celular HeLa, fue posible detectar la expresión de la hormona mediante Western Blot, observándose para los casos de la GH-N del mono rhesus y del lémur la presencia de isoformas proteicas que presentan modificaciones post-traduccionales del tipo glicosilación. Por otra parte, fue detectado en cada caso la presencia de los RNAm mediante RT-PCR, observándose la presencia de la forma principal de este y otras potenciales variantes con patrones de migración electroforética e intensidad menores. En el caso Northern Blot sólo permitió detectar la forma principal del RNAm de GH-N. Los sobrenadantes obtenidos del medio de cultivo se emplearon en ensayos de diferenciación en la línea celular 3T3L1, que permitieron determinar el potencial adipogénico de la hormonas recombinantes a una concentración de aproximadamente 20ng/mL de medio, observándose conversión adipocítica, la cual fue confirmada por RT-PCR de los marcadores de diferenciación PPAR γ y LPL. Por otra parte, los sobrenadantes fueron empleados en la determinación del potencial lactogénico en la línea celular Nb2, observándose

proliferación celular luego del tratamiento con medios suplementados con una concentración aproximada de 0.001nM de hormonas recombinantes.

Conclusión: Los vectores pcDNA3.1/hygro(+) portadores de las unidades transcripcionales de los genes de GH-N de primates son expresados en la línea celular HeLa, detectándose su RNAm, y la proteínas en el medio de cultivo. Estas últimas presentan actividades biológicas, eficientes y comparables, en la inducción de diferenciación adipocítica sobre células 3T3L1 y proliferación en la línea celular Nb2.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Hormona del crecimiento

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína multifuncional secretada por la glándula pituitaria de los vertebrados. En el humano, la GH ha sido estudiada extensamente y consta de 191 amino ácidos, posee dos puentes disulfuro y alcanza una masa molecular de aproximadamente 22kDa. En su forma inmadura incluye una secuencia señal o porción amino terminal hidrófoba de 26 amino ácidos, necesaria para su secreción al torrente sanguíneo. Se ha observado que comparte similitudes, tanto en su estructura como en su función, con una serie de proteínas somatolactógenas, a cuya familia integra, junto con lactógenos placentarios o somatomamotropinas coriónicas (CSH), prolactina (Prl) (Fleenor y cols 2005; Goffin y cols. 1996) y otras proteínas relacionadas(figura1).

La función principal de la GH se relaciona con la regulación del metabolismo y de una serie de procesos involucrados en la estimulación del crecimiento postnatal, en particular de los huesos y del cartílago, donde el crecimiento que provoca se produce por proliferación celular, mas que por un aumento del tamaño de las células; esto gracias a que la GH estimula y regula a nivel celular una serie de moléculas de señalización que inducen cambios en la actividad enzimática, funciones de transporte y expresión génica (Carter-Su y cols., 1996).


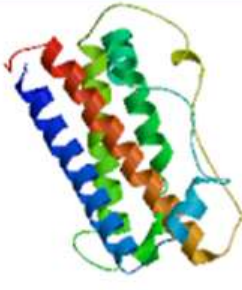

Nombre	Hormona de crecimiento (GH)	Somatomamotropina coriónica (CSH)	Prolactina (PRL)
Estructura			
Función	Actividad somatogénica, estimulación del crecimiento y regulación del metabolismo.	Actividad lactogénica, modifica el metabolismo de la madre durante la gestación a favor del feto.	Actividad lactogénica; desarrollo de la mama, inicio y mantenimiento lactación y regulación inmune

Figura 1: Principales miembros de la superfamilia de proteínas somato-lactogénicas. Se describe la estructura tridimensional y función de los miembros representativos de la superfamilia GH/PRL.

1.1.1.- Historia de la hormona de crecimiento (GH).

Ha pasado medio siglo desde que se aisló la GH a partir de pituitarias de antropoides y de cadáveres humanos, descubriéndose que tenía la capacidad de estimular el crecimiento en niños que sufrían de su deficiencia (Raben, 1957).

A fines de la década de 1960 se descubrieron similitudes estructurales entre la GH, la PRL y la CSH. Sin embargo, no fue hasta el año de 1971 que Nial y colaboradores describieron la estructura aminoacídica de la GH y su similitud con la de la CSH (figura 2), en ese entonces llamada lactógeno placentario o PL. Casi diez años después Fiddes y colaboradores (1979) lograron aislar y caracterizar los genes que codifican para la GH y la CSH, mientras que Harper y colaboradores (1982) descubrieron su localización cromosómica y pertenencia a un mismo locus. Ese mismo año, Barrera y colaboradores descubren precursores del RNAm de la CSH, confirman la existencia de cuatro intrones en todos los genes de la familia y comprueban que dos del tipo CSHs son activos en placenta, notando que codifican para hormonas maduras con secuencias aminoacídicas

idénticas (Barrera-Saldaña, Seeburg y Saunders, 1982). Pero quizás la contribución más importante a este tema sea la de Chen y colaboradores en 1989, al determinar la estructura primaria del locus GH, iniciar su descripción y proporcionar la primeras pistas sobre la evolución de esta familia multigénica.

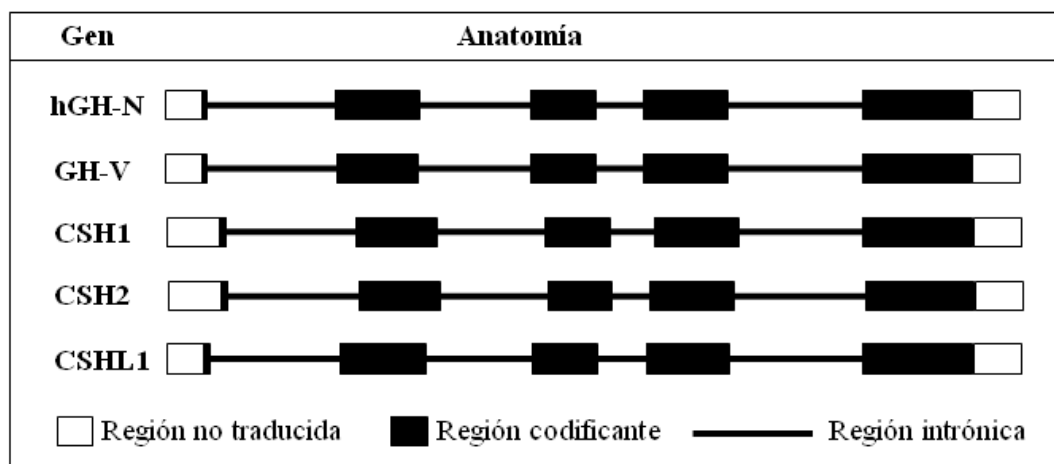


Figura 2: Similitud de los genes del *locus* GH humano. Se representa la estructura de cada uno de los genes miembros del *locus* humano, constituidos por cinco exones (rectángulos en negro) separados por cuatro intrones (líneas).

1.2.- Las familia génica de la GH

Se ha definido como familia génica al conjunto de genes que surgen de la duplicación de un gen ancestral y que comparten una similitud nucleotídica de al menos el 50% (Barsh y cols., 1983). Sus miembros generalmente integran un agrupamiento o cluster en un locus cromosomal, aunque también pueden localizarse en diferentes cromosomas. Las proteínas que codifican suelen tener funciones similares o relacionadas y coinciden o no en sus patrones de expresión temporal y tisular. A nivel nucleotídico se pueden observar diferencias de relevancia entre los miembros que integran una misma familia, tanto en sus regiones codificantes como regulatorias, mismas que subyacen en sus diferencias estructurales y roles fisiológicos.

De acuerdo con los criterios anteriores, el locus humano GH/CSH constituye una familia multigénica. Se ha descrito que los integrantes de esta familia multigénica emergieron durante la evolución de los primates por duplicación génica (Rubin y cols, 1994; Revol y cols., 2004). En un sentido más amplio, esta familia, además de incluir a la

PRL, también abarca a los genes de la proliferina (PLF), proteínas relacionadas a prolactina (PRP), proteínas semejantes a prolactina (PLP) y somatolactina (SL), por su similitud estructural y funcional, aunque ninguno de estos se encuentra dentro del *locus* GH/CSH de dicho orden de animales, salvo por la PRL.

1.3.- Evolución de la GH: de mamíferos a antropoides.

En la mayoría de los mamíferos no antropoides, incluyendo a los prosimios, la GH ha experimentado un lento proceso evolutivo (Wallis, 1996). En ellos, el *locus* consta de un solo gen, mientras que para los antropoides se han descrito media docena de genes relacionados a GH, que han aparecido por eventos sucesivos de duplicación y divergencia (Chen y cols., 1989; Wallis y col., 2002; Ye y cols., 2005). En varios monos del viejo mundo (MVM), en el chimpancé y en el humano, además de genes relacionados a GH, sus *loci* GH poseen genes del tipo CSH (Chen y cols., 1989; Golos y cols., 1993; Revol y cols., 2004, Ye y cols., 2005). Interesantemente, las contrapartes de las CSHs en mamíferos no primates, aún referidas como lactógenos, parecen haber surgido de la rama evolutiva del gen PRL (Walter y cols., 1991). Las secuencias de múltiples genes relacionados a GH se han resuelto y analizado en antropoides (Revol y cols., 2004; Ye y cols., 2005; Li y cols., 2005; Wallis y Wallis 2006), pero a la fecha, la familia GH sólo ha sido estudiada en detalle en el humano.

La rápida evolución de la GH en primates se acompaña también de la evolución acelerada simultánea de su receptor. Esta hipótesis es sostenida a nivel molecular, por la evidencia de conservación y sustitución de residuos importantes para la interacción de la hormona con su receptor, y a nivel fisiológico por la incapacidad de las GHs de especies no- primates para unirse al receptor de la GH del humano (hGHR). Esta especificidad de especie está dada por un cambio de Leu→Arg en la posición 43 del hGHR, el cual fue precedido por un cambio de His→Asp en la posición 171 de la GH (Souza y cols., 1995), lo que indicaría que la presión evolutiva fue por parte de la GH a su receptor y no a la inversa (figura 3).

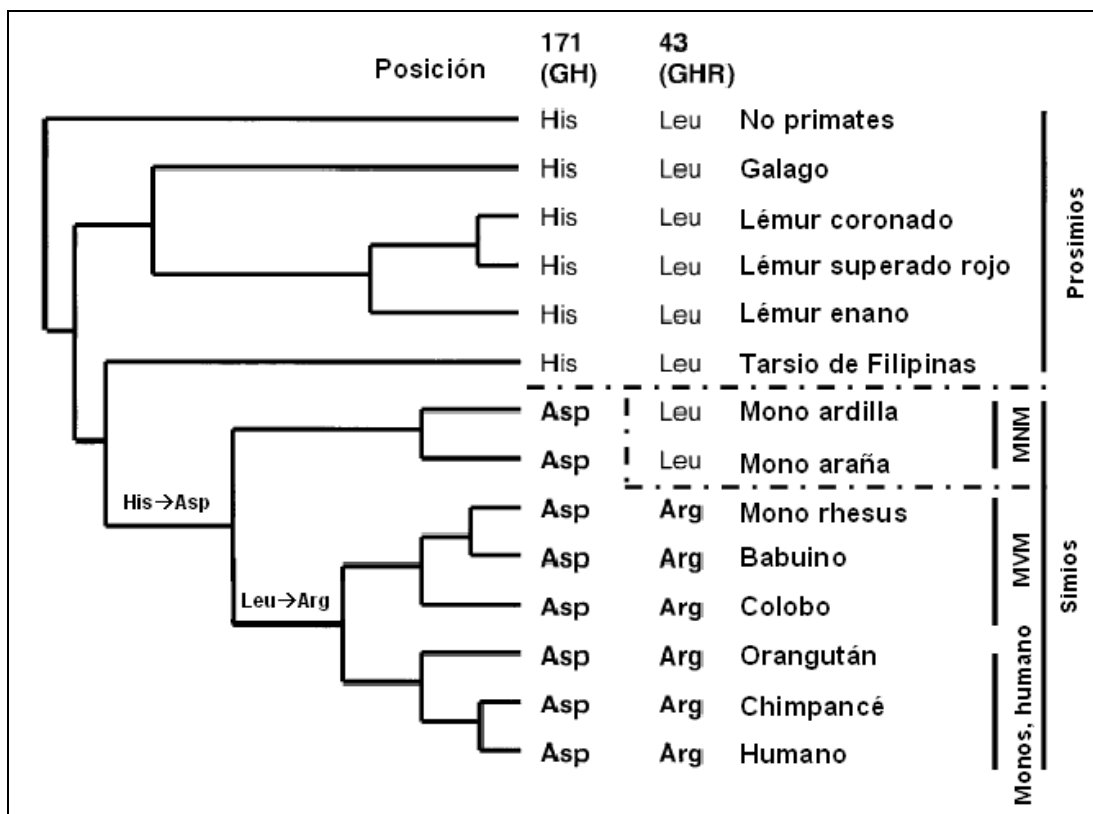


Figura 3: Reemplazo de aminoácidos en la posición 171 de la GH y en la posición 43 del GHR. Se representa el árbol filogenético de los primates y los reemplazos aminoacídicos experimentados en la hormona con respecto a su receptor. En negritas son indicados los reemplazos similares a los observados en el humano y las líneas segmentadas destacan la transición experimentada en MNM. Figura extraída de Liu y cols. (2001).

La especificidad del hGHR emerge de un ancestro común en los monos del viejo mundo, hipótesis que es apoyada por el reemplazo de residuos aminoacídicos observados en la GH de los primates posterior a la transición MNM-MVM (Liu y cols., 2001). Los cambios a nivel de secuencia proteica que afectan a las GHs de primates podrían ser atribuidos a la adquisición de nuevas funciones por esta hormona. Es bien conocido que las GHs de especies de primates son únicas en la familia GH, pues presentan tanto actividad lactogénica como somatogénica (Goffin y cols., 1996).

1.4.- Estructura y Función

1.4.1.- Estructura del locus GH en humanos

El locus de GH/CSH del humano está constituido por cinco genes que, incluyendo el promotor adyacente y la región de terminación transcripcional, cada uno abarca cerca de

tres mil pares de bases (3 kb). Se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 17 y más específicamente en la banda q22.4 (Harper y cols., 1982), desplegando sus miembros una misma dirección transcripcional y el siguiente orden: 5'-(hGH-N»CSH-1»CSH-2»hGH-V»CSH-3)-3', y conociéndose ya los productos transcripcionales y traduccionales de cada uno de ellos. (figura 4).

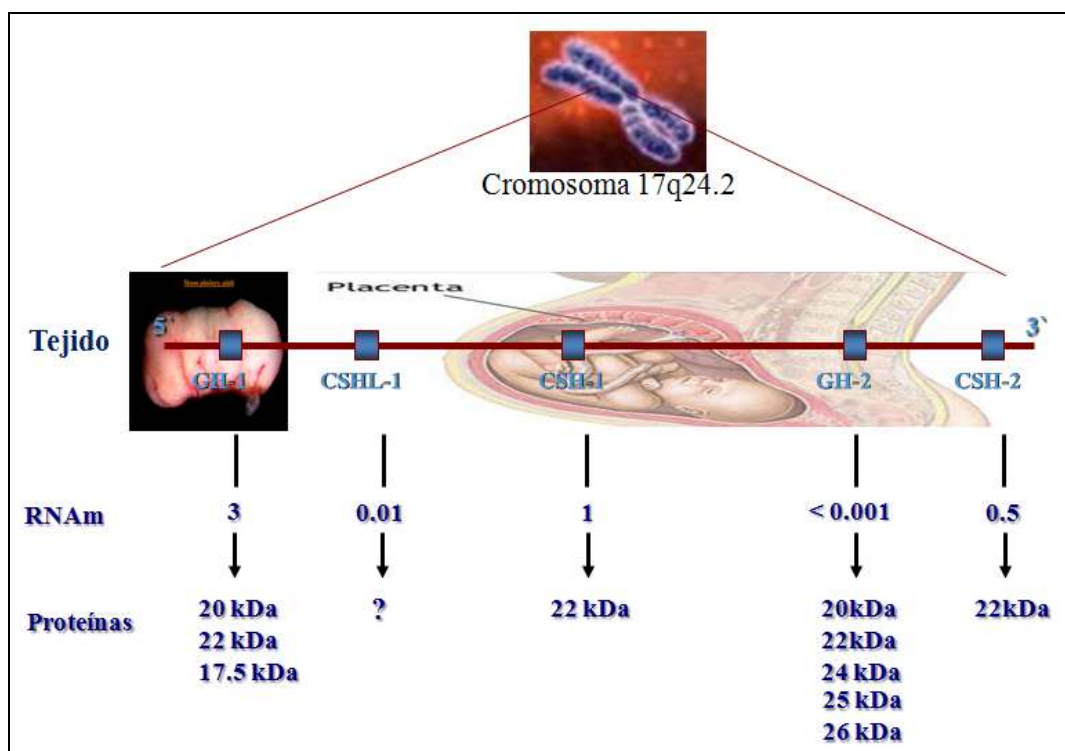


Figura 4: El locus GH humano. Se indican la localización cromosómica, número y distribución de los genes miembros del locus, la especificidad tisular de expresión y las isoformas proteicas generadas.

Además, los integrantes de este locus presentan una alta similitud en sus secuencias nucleotídicas (aproximadamente del 95%), que incluso se extiende hacia ambos lados de las unidades transcripcionales (UT) (figura 2). Sin embargo, a pesar del elevado grado de similitud existente entre los genes y sus regiones flanqueantes, éstos manifiestan diferencias en su especificidad tisular y niveles de expresión, atribuidos a cambios sutiles en sus promotores, como a la presencia de elementos reguladores adicionales, tales como los potenciadores e inhibidores presentes en las regiones intergénicas del locus.

En cuanto a los promotores de los genes integrantes de este *locus* se ha descrito que los elementos localizados en la región de los primeros 500 nucleótidos anteriores (río arriba) al inicio de la transcripción, conocida como región promotora proximal, es la encargada de dirigir la expresión del gen hGH-N en los somatotrofos de la pituitaria anterior. Se postula que la principal acción reguladora la ejerce el factor transcripcional de unión al DNA Pit-1/GHF1 (Karin y cols., 1990). Por otra parte a 2Kb río arriba de la región promotora de los genes que manifiestan expresión sólo en placenta (hGH-V y hCSHs) se ha descrito la presencia de una región represora, conocida también como elemento "P", la cual se encarga de impedir la expresión de los genes placentarios en la hipófisis, mediante la interacción con factores que impiden la unión de Pit-1 (Nachtigal y cols., 1993; Barrera-Saldaña, 1998) (figura 5).

Por otra parte, potenciadores o *Enhancers* se encuentran localizados 2Kb río abajo de los genes hCSH, para incrementar la expresión de estos genes en la placenta (Jacquemin y cols, 1994; Barrera-Saldaña, 1998) (figura 5)

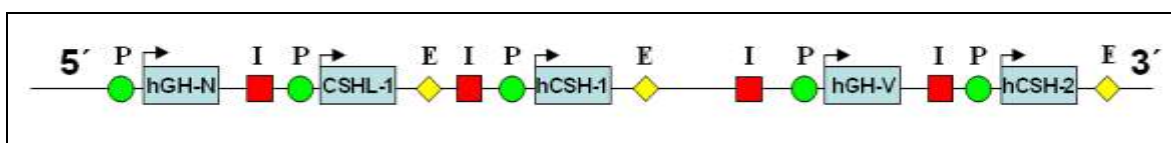


Figura 5: Elementos involucrados en la regulación de la expresión de los integrantes del locus GH/CSH. Se representa la estructura del *locus* humano destacándose la posición de los promotores proximales (P; círculos verdes), regiones represoras (I; elemento "P" en cuadros rojos) y potenciadores (E; rombos amarillos).

Gracias a la presencia de los elementos antes mencionados, el primer gen del locus, el hGH-N se expresa en la hipófisis, mientras que el resto lo hacen en la placenta (Chen y cols., 1989; Golos y cols., 1993). En este sentido, el gen hGH-N codifica para la GH hipofisiaria, mientras que el gen hGH-V para la GH variante o placentaria, la cual reemplaza a la primera en la sangre materna durante el embarazo. Los genes CSH-1 y CSH-2 se expresan en el sincitiotrofoblasto de la placenta, codificando ambos para una misma CSH madura (Barrera y cols., 1983). En cuanto al tercer gen del tipo CSH, el CSHL-1, se

ha descrito como un pseudogen (Reséndez y cols., 1990) (figura 4).

Interesantemente, durante la maduración del transcrito primario del gen hGH-N mediante el uso alternativo de la señal aceptora para la remoción del segundo intrón mediante la remoción diferencial de intrones (“splicing” alternativo) genera dos especies de RNAm que varían en 45 nucleótidos y se traducen en sendas isoformas proteicas: una de 22 kDa, que es la más conocida y abundante (90%) y una de 20 kDa (10%). Este hecho también se observa en el caso del gen hGH-V (Frankenne y cols., 1987), lo que contrasta con una sola isoforma conocida de los tres genes CSHs.

1.4.2.- Estructura del *loci* GH en primates.

En el caso de los diferentes órdenes de primates, diversos grupos de investigación, incluyendo el nuestro, han enfocado su esfuerzo en el intentar comprender cómo ha evolucionado esta interesante familia génica, a partir de un solo gen en prosimios, hasta múltiples en los antropoides en tan sólo sesenta millones de años. Hasta el momento se ha generado bastante información de los genes que constituyen los *loci* de diferentes especies, pero sólo para algunos de ellos tenemos clara su organización. A pesar de este logro, poco o nada sabemos en la actualidad en cuanto a su expresión y a las proteínas que generan.

En el caso del mono araña (*Ateles geoffroyi*), representante de los monos del nuevo mundo (MNM), el *locus* GH está constituido por seis genes, cinco del tipo GH teóricamente activos (ya que faltan evidencias de su expresión) y un pseudogén (Revol y cols., 2004). Al igual como se ha observado en otras especies, la secuencia aminoacídica predicha para el gen GH-N o hipofisiario está bien conservada, apreciándose pequeñas diferencias que van de la mano con la evolución de su receptor (Liu y cols., 2001). Por otra parte, se ha observado que en los restantes integrantes del locus se han acumulado una serie de cambios a lo largo de su secuencia codificante, lo que ha ocasionado que las proteínas predichas para ellos presenten incluso hasta menos de un 75% de similitud respecto de la GH- (Revol y cols., 2004).

Para el mono Rhesus (*Macaca mulatta*), un representante de los monos del viejo mundo (MVM), se ha descrito que el *locus* está constituido por seis genes, al igual que en el mono araña. Sin embargo en este caso, aparte de dos genes de GHs, postulados uno como hipofisiario y el otro como placentario, el resto de genes del *locus* son del tipo CSH.

Respecto a los grandes simios, se ha descrito la organización para el locus del chimpancé (*Pan troglodytes*), el cual está constituido por dos genes de GHs y tres del tipo CSH (Pérez Maya, tesis Maestría 2008). De igual forma, gracias al trabajo desarrollado por nuestro grupo en el campo de la genómica comparativa, se ha comenzado a comprender cómo se encuentra organizado el locus del gorila (*Gorilla gorilla*), observándose al igual que en chimpancé genes del tipo GHs y CSHs, con un gen que codifica para la GH hipofisiaria.

1.4.3.- Funciones de la familia GH.

A.- GH hipofisiaria (GH-N)

La HGH-N es secretada por los somatotrofos desde las siete u ocho semanas de vida fetal para ejercer múltiples funciones en estados tempranos del desarrollo embrionario. Sin embargo, su función presenta una mayor importancia en el periodo neonatal, donde son observados elevados niveles justo antes del nacimiento y durante el periodo postnatal inmediato. Posteriormente, la función ejercida por esta hormona en el mantenimiento del crecimiento somático normal del individuo, es fundamental durante la etapa de la niñez y adolescencia. En la etapa adulta los niveles de la hormona se estabilizan, para luego comenzar a decaer pasados los 35 años.

El efecto de la GH es principalmente ejercido sobre tres tejidos blanco: hígado, tejido adiposo y epífisis de los huesos. En estos tejidos induce una serie de efectos en la síntesis proteica, retención de nitrógeno, incremento de la captación y el metabolismo de la glucosa, síntesis de DNA y en la lipólisis. Todo esto origina un incremento en el crecimiento lineal de los condrocitos, aumento en la masa magra corporal (efecto sobre la musculatura) y disminución de la adiposidad (Osafo y cols., 2005) (figura 6)

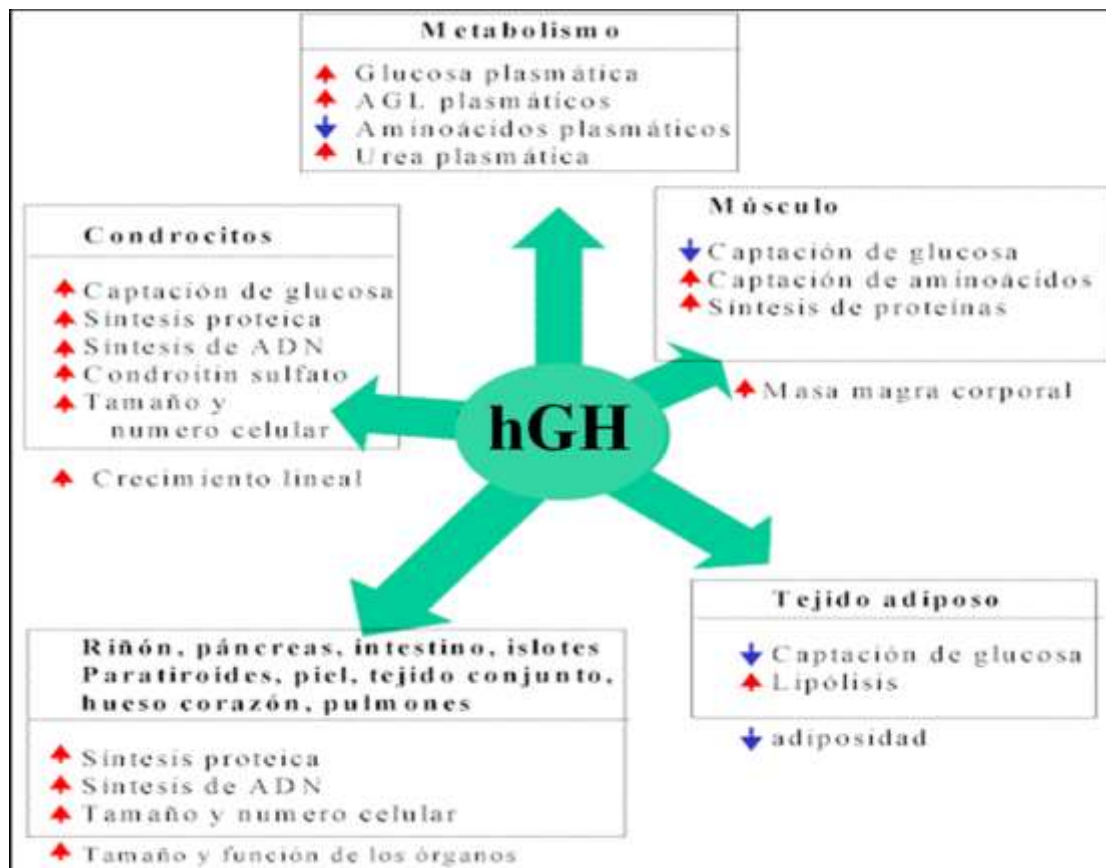


Figura 6: Esquema general de acción de la hGH. Se representan los efectos de la hGH en diferentes tejidos.

B.- GH placentaria (GH-V)

La HGH-V es expresada en la placenta y reemplaza a la HGH-N durante el embarazo, de la cual difiere en 13 posiciones aminoacídicas. Manifiesta una elevada actividad somatogénica y remarcados efectos en el metabolismo de los carbohidratos y la lipólisis, pero una baja actividad lactogénica (Osafo y cols., 2005). Su rol clave se ha postulado en el crecimiento fetal, al actuar en el metabolismo materno para asegurar la disponibilidad de nutrientes para el feto (Handwerger y Freemark, 2000).

C.- CSH

Al igual que la HGH-V, la HCSH es expresada en la placenta. Los dos genes CSHs activos del locus humano son inducidos coordinadamente durante el primer mes de gestación. La concentración máxima de esta hormona se alcanza en el sexto mes del embarazo. Mantiene el suministro constante de glucosa y ácidos grasos al feto,

estimulando la lipólisis materna por manipulación de las concentraciones y la sensibilidad materna a la insulina. La función principal de esta hormona es lactogénica, siendo equipotente en su función con la PRL (Osafo y cols., 2005). Un resumen de los perfiles de aparición y desaparición de las hormonas durante el embarazo, se ilustran en la figura 7.

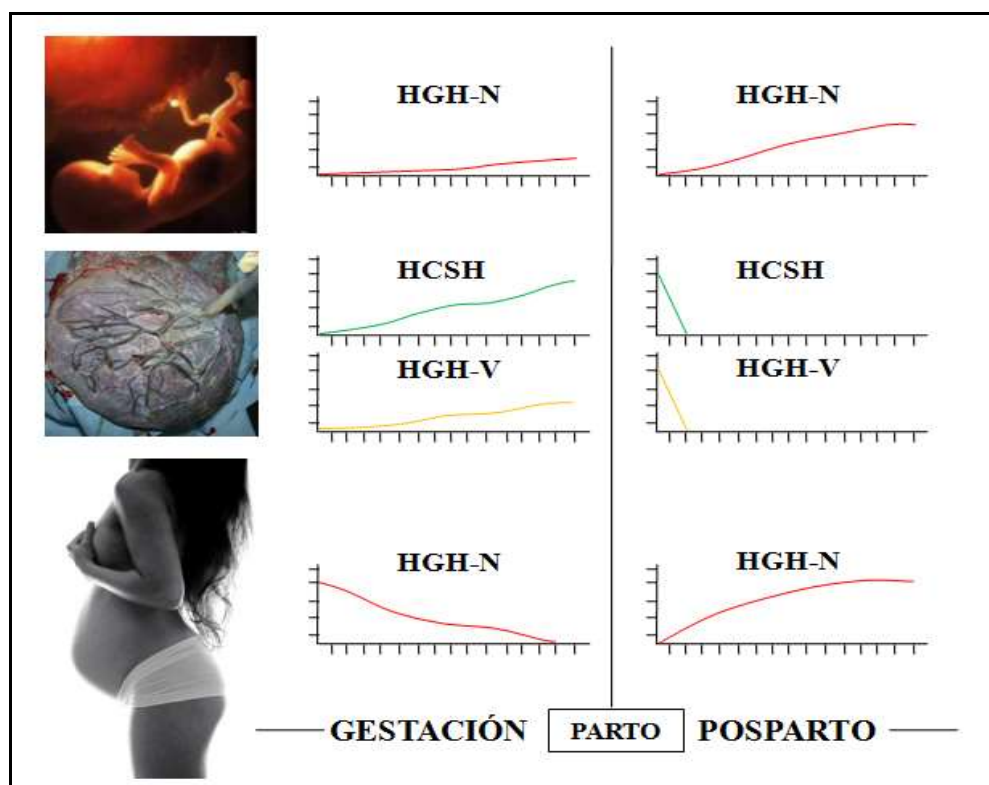


Figura 7: Perfiles de expresión de hormonas HGH-N, HGH-V y HCSH durante el embarazo. Son representados en gráficas los niveles de las distintas hormonas en el feto, placenta y en la madre, durante el embarazo y posparto.

1.4.4.- Mecanismo de acción de la GH-N:

Se ha propuesto que cada molécula de GH tiene la capacidad de interactuar con dos moléculas de receptor, produciendo la dimerización de éste (figura 8) (Leung DW y cols., 1987; De-Vos y cols., 1992).

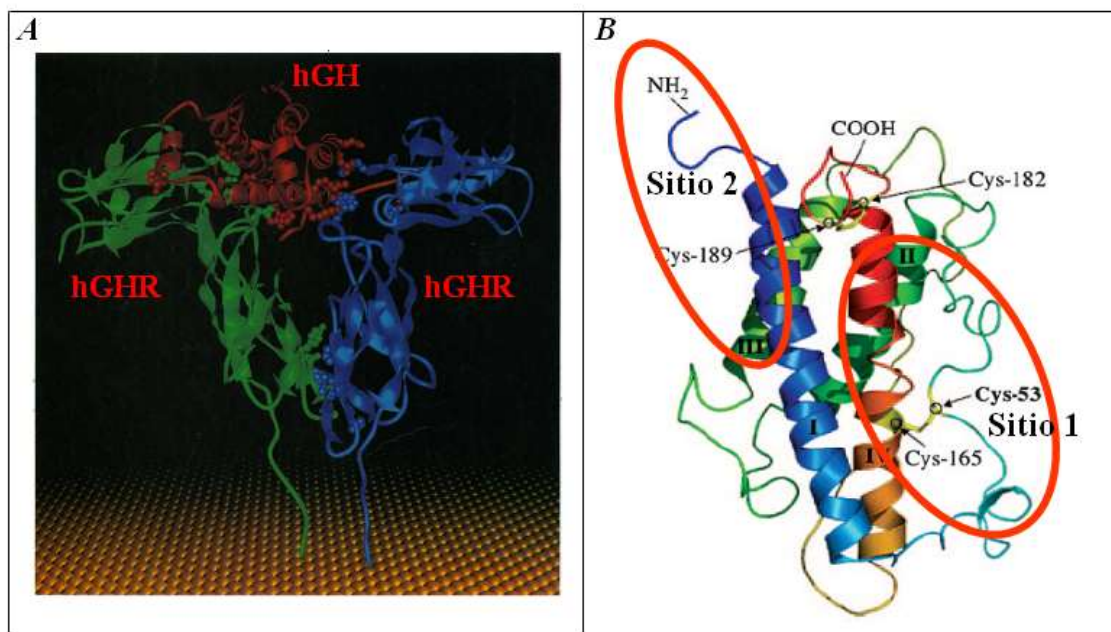


Figura 8: Interacción de hGH con hGHR. (A) Imagen generada a partir de los datos de cristalografía de rayos X que muestra la interacción de una molécula hGH con dos del hGHR, produciendo un dímero del receptor. Tomada de de-Vos y colaboradores (1992). (B) Modelo tridimensional de la hGH en el cual son indicados con números romanos las cuatro hélices alfa que forman parte de la hormona y los dos sitios involucrados en la interacción con hGHR: *sitio de unión 1* que interactúa con el primer hGHR, formado por tres regiones discontinuas integradas por el giro (loop) comprendido entre los aminoácidos 54 a 74 (exón III), la porción COOH de la cuarta hélice (exón V) y en menor grado por el extremo NH₂ terminal de la primera hélice (exón II); sitio 2 que interactúa con el segundo hGHR formado por los aminoácidos 1 al 8 (exón II) y 109 al 128 (exón IV) (Juárez y cols., 1999).

Esta interacción induce la activación de la tirosin cinasa JAK2 (janus kinase 2) asociada al receptor (Argetsinger y cols., 1993), lo cual a su vez estimula la fosforilación tanto del propio receptor como de JAK2, desencadenándose una cascada de señalización intracelular que involucra las siguientes rutas (Carter-Su y cols., 1996) (figura 9):

- MAP cinasas (mitogen activated protein) que conduce a la activación de otras cinasas (ejemplos $p70^{\text{rsk}}$ y $p90^{\text{rsk}}$), fosfolipasa A2, proteínas del citoesqueleto y factores de transcripción.
- IRS-1 y 2 (insuline receptor substrate), así como PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa); lo que conduce al reclutamiento en la membrana plasmática de los transportadores de glucosa GLUT-1 y 4, ocasionando un efecto tipo insulina al incrementar el

transporte de glucosa.

- Fosfolipasa, formación de DAG (diacil glicerol) y activación de PKC (proteína cinasa C), originándose un incremento en la concentración del ión calcio intracelular.
- Factores de transcripción Stats (signal transduction and activators of transcription) 1, 3 y 5.
- Eventos a nivel nuclear que resultan en la activación de la expresión génica.

Estas rutas de señalización conducen a los cambios inducidos por acción de la GH en la actividad enzimática, transporte y expresión génica, que finalmente culminan con cambios en el metabolismo y en el crecimiento.

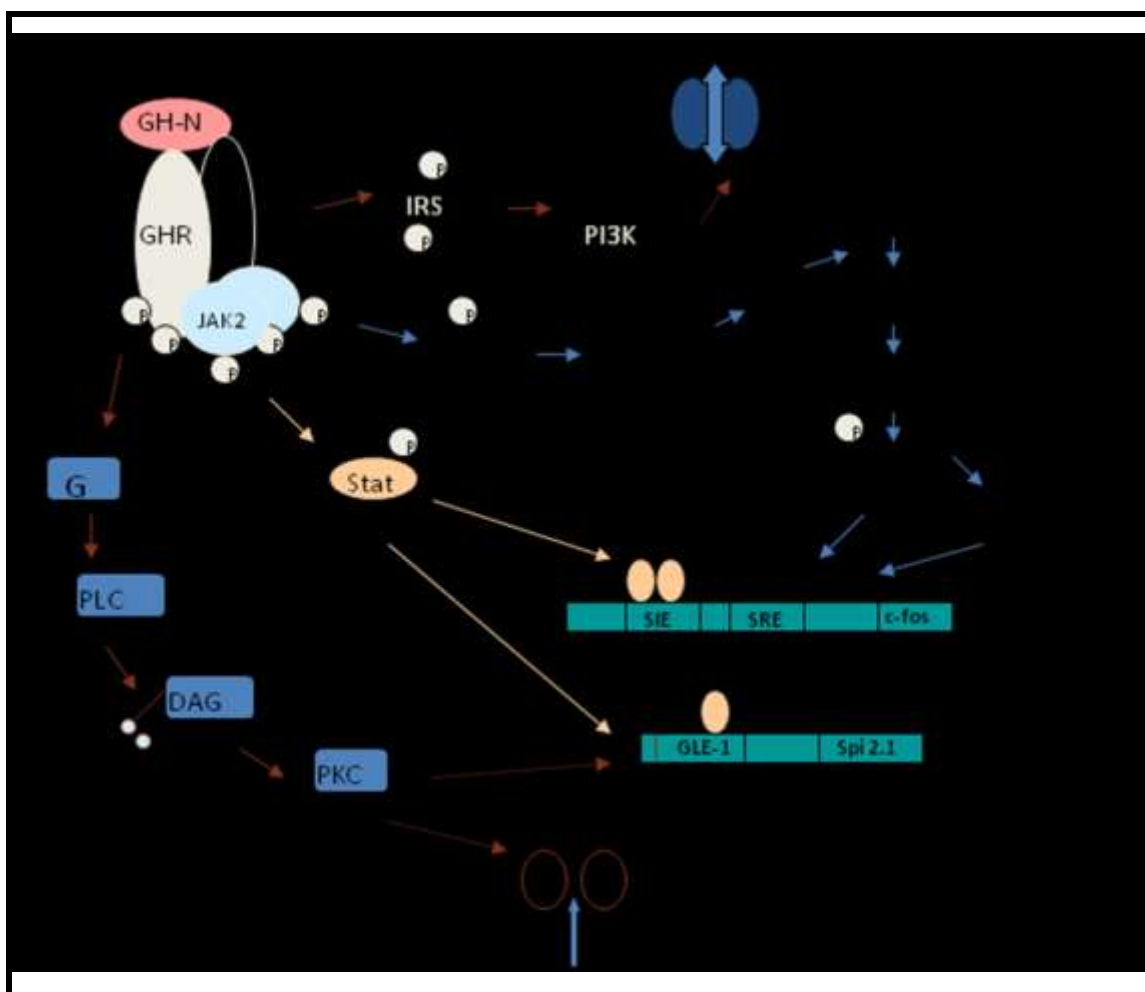


Figura 9: Mecanismo molecular de acción de la GH. En la figura se muestran las rutas de señalización activadas por la interacción de la GH con su receptor (GHR). Las flechas

indican las rutas de señalización involucradas en la transducción de las señales inducidas por la hormona. Tomado de Carter-Su y colaboradores (1996).

Por otra parte, la GH presenta capacidad lactogénica, al interactuar con el receptor de PRL (PRLR) (figura 10) (Somers y cols., 1994). Al respecto se han descrito una serie de residuos aminoacídicos relacionados con esta interacción, y que han sido conservados a lo largo de la evolución (Liu y cols., 2001). Esta interacción desencadena, al igual que en el caso de GHR, la activación a nivel intracelular de JAK y STAT (Bole-feysot y cols., 1998). Por otra parte se ha descrito que la GH-N estimula la producción del RNAm de PRLR, lo que puede ser un importante mecanismo de adaptación de las células β del páncreas durante condiciones de aumento de la demanda de insulina en el periodo de embarazo (Galsgaard y cols., 1999).

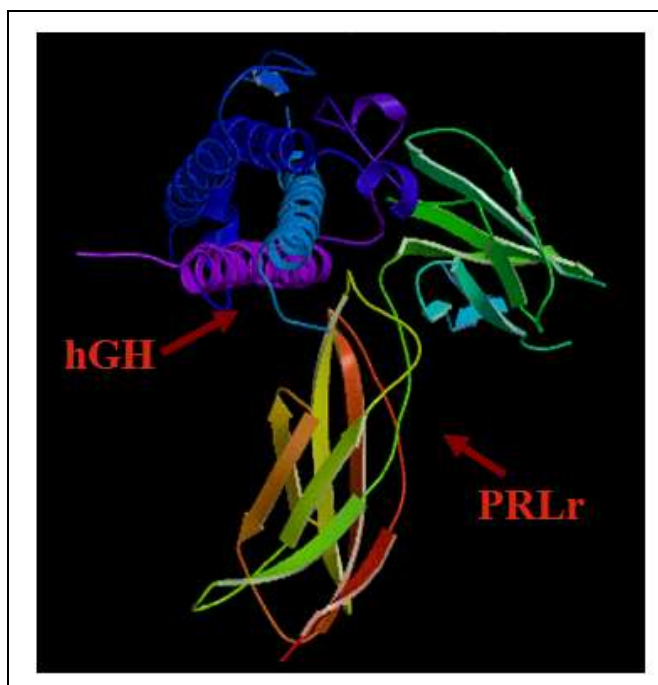


Figura 10: Interacción de hGH con el receptor PRLR. Imagen generada a partir de los datos obtenidos por cristalografía de rayos X que muestra la interacción de la GH con PRLR. Tomada de Somers y colaboradores (1994).

1.5.-Modelos de estudio para GH

1.5.1.-Modelo de diferenciación adiposa

Como ya se ha mencionado, la GH estimula el crecimiento somático de los tejidos, además de poseer la capacidad de promover la diferenciación de líneas celulares derivadas de mesénquima (Ohlsson y cols., 1992), incluyendo preadipocitos (Morikawa y cols.,

1984). En este último caso, cuando se estimula con señales fisiológicas adecuadas, los preadipocitos 3T3-L1 sufren cambios programados en su expresión genética que los conducen a la expresión de un fenotipo adiposo, similar al del tejido adiposo blanco. Esta diferenciación celular es caracterizada por tres etapas (Green y cols., 1985; Pairault y Liesner, 1987) que pueden ser reguladas por señales extracelulares:

- i. - compromiso celular hacia un fenotipo;
- ii. - amplificación clonal de las células;
- iii. - expresión del fenotipo.

Durante este proceso los preadipocitos sufren diferentes cambios morfológicos y enzimáticos. En el caso de la subclona 3T3-L1, derivada de los fibroblastos de embrión de ratón Suiso 3T3 (Todaro y Green., 1963; Green y Kenhide., 1976), se conoce que es capaz de responder a las hormonas de otras especies, incluyendo la del bovino y la del humano (Kuri-Harcuch y Green., 1978). Esto fue determinado mediante la formación de agrupaciones de adipocitos, detectados mediante tinción de triacilglicerol con rojo oleoso O (Ramírez y col., 1992).

En las últimas dos décadas la hGH ha sido el factor adipogénico más estudiado, debido a la disponibilidad de su versión recombinante (Morikawa y col., 1984). La GH no induce la conversión adiposa de fibroblastos únicamente, sino que también tiene efectos lipolíticos en adipocitos maduros. Se ha postulado que la respuesta inmediata a la unión de la GH a su receptor presente en los fibroblastos 3T3-L1 (Foster y cols., 1988) induce la activación de las rutas de señalización antes mencionadas (Carter-Su y cols., 1996) como la inducción de MAP cinasa, p90rsk y fosforilación en residuos de tirosina de IRS-1 (Insulin receptor substrate-1) (Campbell y col., 1992).

Se ha descrito que el proceso de diferenciación es acompañado por una serie de cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto y de la matriz extracelular (Spiegelman y cols., 1982), así como por un incremento de la expresión en las células adiposas de los marcadores PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) y c/EBP α (CCAAT enhancer-binding protein α) (Farmer y cols., 2006), los cuales han sido señalados como reguladores críticos en el proceso de adipogénesis, dado que su ausencia previene el desarrollo de tejido adiposo.

1.5.2.-Modelo lactogénico.

La prolactina humana (HPRL) y la HGH son proteínas homólogas sintetizadas en la glándula pituitaria en todos los vertebrados. Estas hormonas están involucradas en una amplia gama de actividades biológicas relacionadas a la lactancia, reproducción y regulación inmune (HPRL) y al crecimiento del cuerpo y diferenciación celular (HGH). Como se dijo arriba las actividades biológicas de la HPRL y la HGH son mediadas por sus respectivos receptores de membrana: PRLR y HGHR, respectivamente, ambos pertenecientes a la familia de receptores de citocinas (Freemark y cols., 1991).

La línea celular Nb2, derivada de linfoma de rata, es un valioso modelo celular para la determinación de la actividad lactogénica de las PRLs y GHs (Gout y cols., 1980). El efecto mitogénico, mediado en parte por la activación de la expresión del gen c-myc (Fleming y col., 1985) y modulado por la vía de transducción de señales acoplada a la proteína G (Too y col., 1989), también ha sido atribuido a la CSH (Colosi y cols., 1987), dada su capacidad de interactuar con PRLR en preparaciones de membranas ováricas de ratón en ensayos de competencia (MacLeod y cols., 1991).

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Junto con los trabajos realizados previamente en el campo del *locus* GH humano, nuestro laboratorio se ha enfocado en el desarrollo de un proyecto de genómica comparativa de los *loci* de la GH en especies representativas de los diferentes órdenes de primates, el cual, sumado a los trabajos realizados en el tema por otros grupos de investigación, ha permitido comenzar a comprender cómo se encuentran organizados estos *loci* y las fuerzas evolutivas que han participado en el surgimiento de los genes que los integran.

En cuanto a la organización génica, en la mayoría de los mamíferos, incluyendo a los prosimios como el lemur, el *locus* GH posee un sólo gen GH, mientras que en los MNM, MVM y grandes monos poseen de cinco a ocho genes GHs o relacionados, agrupados en el mismo locus (Chen y cols., 1989; Wallis y Wallis., 2002), que se postula han aparecido por eventos sucesivos de duplicación y divergencia a lo largo de la evolución (Ye y cols., 2005).

Luego de conocerse la organización del locus humano (Chen y cols, 1989), se han ido dilucidando la organización del *locus* GH del marmoset (*Callithrix jacchus*) y mono capuchino (*Cebus albifrons*) (Wallis y cols., 2006) y nuestro grupo ha resuelto prácticamente la totalidad de la organización de los *loci* del lemur (*Lemur catta*), chimpancé (*Pan troglodytes*) (Revol y cols., 2004), gorila (*Gorilla gorilla*), mono rhesus (*Macaca mulata*) (González y cols., 2006) y mono verde (*Cercopithecus aethiops*). Además se ha observado que las unidades transcripcionales de dichos genes GH conocidos hasta la fecha, y los de los nuevos que han sido secuenciados en nuestro laboratorio, poseen intrones y exones en número y tamaño similares entre ellos (Chen y cols, 1989; DeNoto y cols, 1981).

En el caso del humano, los genes integrantes del *locus* han sido extensamente estudiados. Estos presentan marcadas diferencias en su especificidad tisular, sus niveles de

expresión y sus funciones (Chen y cols., 1989). Gracias a la disponibilidad de técnicas de DNA recombinante y biología celular, ha sido posible analizar in-vitro el potencial codificante y de actividad biológica de los productos codificados de este *locus*. Esto al recurrir a la construcción de vectores de expresión para las UT de cada uno de los genes, y transfectarlos en diferentes líneas celulares, posibilitando el análisis del grado de expresión y actividad de sus productos (Ramírez y cols., 1990; Reséndez y cols., 1990; Rincón y cols., 1993; Juárez y cols., 1999).

Por otro lado, en base a la información disponible ha sido posible determinar, tanto la estructura de la GH, la de los receptores con los que interactúa (GHR y PRLR), así como los residuos aminoácidos fundamentales para que se desarrolle esta interacción, en las diferentes especies de primates (Liu y cols., 2001). Por otra parte, se han desarrollado una serie de modelos de laboratorio para analizar la actividad de estos genes y comprender los mecanismos moleculares desencadenados a partir de la interacción GH-GHR (Kuri-Harcuch y Green, 1978; Gout y cols., 1980; Foster y cols., 1988; MacLeod y cols., 1991; Carter-Su y cols., 1996; Juárez y cols., 1999; Waters y cols., 2006). Sin embargo, el conocimiento generado hasta el momento es mayoritariamente para los integrantes del *locus* humano, permaneciendo desconocida aun la información para la mayoría de los *loci* a lo largo de la escala evolutiva de los primates, lo que permitiría reconstruir los pasos por los que ha pasado el *locus* GH hasta alcanzar el rol clave, que en nuestro laboratorio se postula contribuyó al éxito evolutivo de nuestra especie.

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En nuestro laboratorio se ha generado bastante información en cuanto a la organización de los *loci* de GH de diferentes especies de primates. Sin embargo, aún no se logra comprender cómo y por qué en un corto periodo de tiempo ocurrió un dramático proceso evolutivo en el cual el *locus* pasó de un solo gen en la mayoría de los vertebrados y en los prosimios, a múltiples genes de GH primero y luego a la aparición de la CSH y más tarde de la GH-V (figura 11).

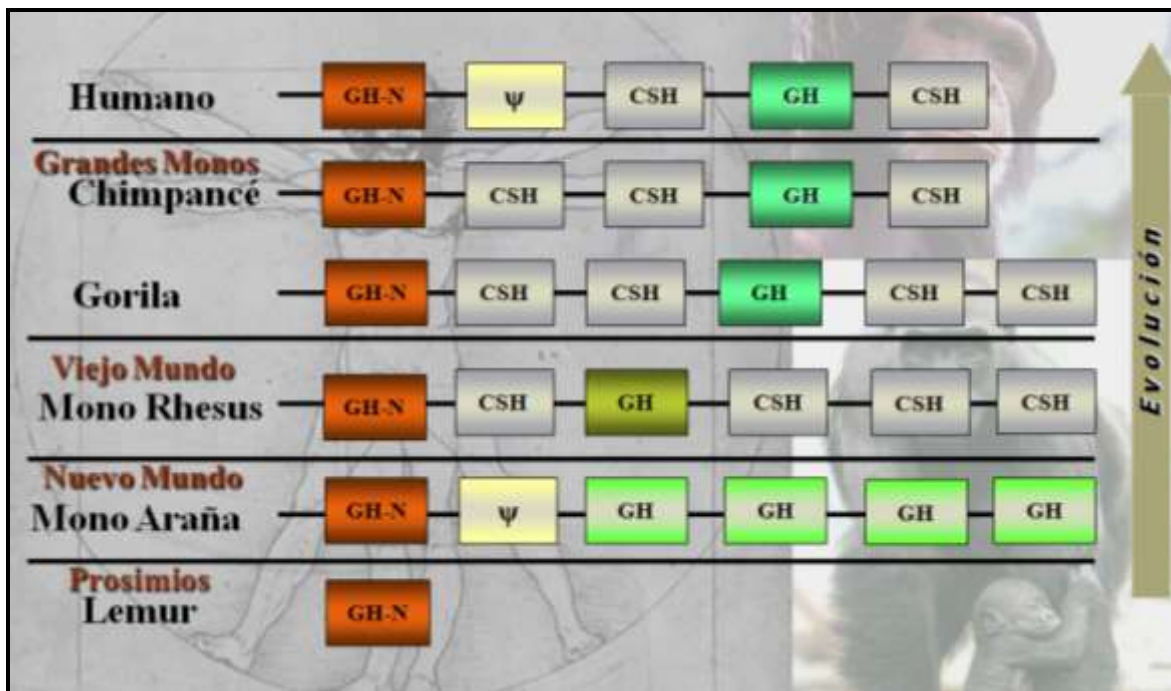


Figura 11: Organización de los *loci* GH en primates. Se representa la estructura de seis *loci* de especies representativas de prosimios, monos del nuevo mundo, del viejo mundo, dos especies de grandes monos (gorila y chimpancé) y humano.

Tampoco se comprende cómo esta ruta evolutiva pudo verse reflejada en la especialización funcional de las respectivas hormonas y en el comportamiento de cada uno de los genes constituyentes del *locus*, en cuanto a sus diferencias en sus patrones de

especificidad tisular y temporal de expresión.

La información generada hasta el momento es más bien estructural. Pero aún falta revelar para cada uno de los genes integrantes de los respectivos *loci* si son funcionales, cuántos mensajeros originan y si éstos son capaces de originar proteínas. Así como, en el caso de originarlas, qué tipo de modificaciones postraduccionales pudieran experimentar, y cuáles diferencias en actividad biológica las distinguirían.

Para dar respuesta a estas interrogantes es posible enfocar el trabajo de dos formas:

- **Análisis ontogénico** (figura 12):

Involucra el *locus* GH/CSH de una especie en particular, al cual se le analiza el potencial codificante y se ensaya la actividad biológica in-vitro o in-vivo de los productos de cada uno de los genes integrantes del *locus* en cuestión. Por ejemplo analizar el *locus* completo del chimpancé, al igual como ya se ha realizado en el humano. En este tipo de análisis, los genes involucrados son referidos como parálogos, es decir son genes relacionados que han surgido por eventos de duplicación de un gen ancestral dentro del genoma de la especie bajo estudio y que han adquirido presumiblemente nuevas funciones.



Figura 12: Análisis ontogénico en un *locus* específico de GH. Se investigan los miembros del *locus*.

- **Análisis filogénico** (figura 13) :

Involucra sólo los genes del mismo tipo (referidos como **ortólogos**) en los *loci* de diferentes especies de interés, para los cuales se realiza el análisis del potencial codificante,

traduccional y funcional. En este último caso podremos observar si a lo largo de la evolución estos genes han experimentado especialización en su función, ya sea por ganancia de nuevas propiedades o pérdida de éstas, algunas de las cuales estarían presentes en sus contrapartes de especies menos encumbradas en la escala o árbol de la evolución.

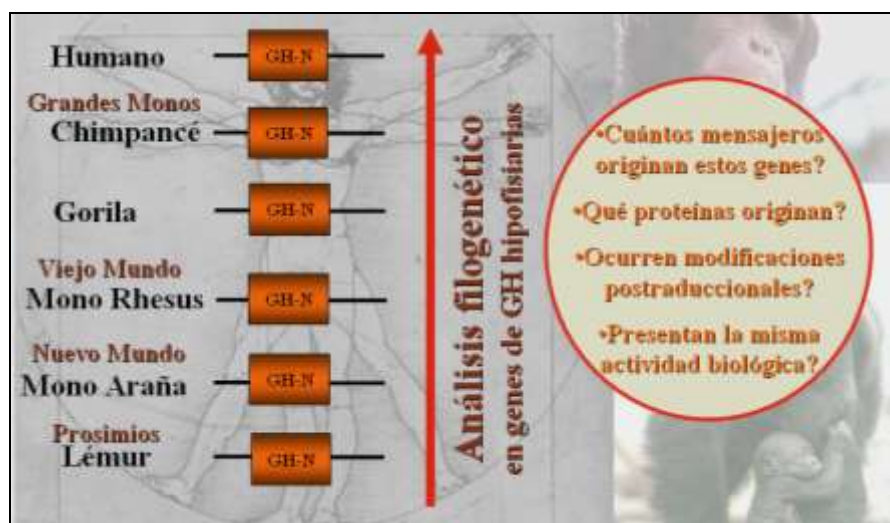


Figura 13: Análisis filogenético de un gen del *locus* GH a lo largo de la evolución de *loci* representativos de primates. Se compara al mismo gen entre diferentes *loci*.

En este trabajo se propuso realizar un estudio comparativo genómico-fisiológico de la GH-N, empleando la estrategia de análisis filogenético para los genes de GH-Ns pertenecientes a una serie de *loci* GH de primates, con la finalidad de averiguar cómo se llegó a la situación actual del gen en el locus humano (cuadro 1).

Cuadro 1: Análisis comparativo y funcional de genes GH de primates.

Especie de origen del gen GH-N		RNA _m	Proteínas		Actividad Biológica	
		Variantes	Isoformas?	Modificada?	Adipogénesis	Lactogénesis
	Humano	2	2	No	Si	?
GM	Chimpance	?	?	?	?	?
	Gorila	?	?	?	?	?
VM	Mono Rhesus	?	?	?	?	?
NM	Mono Araña	?	?	?	?	?
PS	Lémur	?	?	?	?	?

GM: Grandes monos; VM: Viejo Mundo; NM: Nuevo Mundo; PS: Prosimio

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general:

Comparar el potencial codificante y funcional de los genes de GHs hipofisiarias (GH-N) a lo largo de la evolución de los *loci* de especies representativas de grupos de prosimios, MNM, MVM y grandes monos, usando como referencia a la hGH-N.

4.2.- Objetivos específicos:

- Construir y caracterizar vectores de expresión para células eucariotas, portadores de los genes GH-N de interés.
- Determinar in-vitro el potencial transcripcional (variantes de RNA_m) y codificante (isoformas proteicas) para cada uno de los genes en estudio.
- Comparar el potencial biológico de las GHs, también en modelos in-vitro:
 - Cultivo de la línea celular 3T3-L1: potencial adipogénico.
 - Cultivo celular de la línea Nb2: potencial lactogénico.

CAPITULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- Material.

Para el desarrollo del trabajo experimental se requirió de los siguientes productos:

A. Material biológico y vectores de clonación

Los plásmidos recombinantes portadores de los genes GH y el DNA genómico de primates empleados en este trabajo, provienen de la genoteca del Laboratorio de Genómica y Bioinformática de la U.L.I.E.G., en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. La fuente original de los vectores TOPO TA y pcDNA 3.1 hygro (+) fue la casa comercial de Invitrogen-Life Technologies (Carlsbad, CA).

B. Reactivos químicos y enzimáticos

Los reactivos empleados para preparar soluciones amortiguadoras, medios de cultivo, geles, y todos los otros reactivos de grado analítico, necesarios para realizar este trabajo, se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical (St, Louis, Missouri, EUA), Merck (Monterrey, México), Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EUA), DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA) y United States Biochemical (Cleveland, Ohio, EUA)

Las enzimas de restricción y los desoxinucleótidos empleados en la reacción en cadena

de la polimerasa, así como la enzima RNase H empleada en la reacción de transcripción reversa provienen de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA).

Los reactivos empleados para realizar la PCR fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: Taq DNA Polimerasa (Taq Recombinant) y el $MgCl_2$ fueron obtenidas de Fermentas Life Sciences, los iniciadores empleados para la amplificación de GH (primers) provienen de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

La enzima RNase OneTM utilizada para el tratamiento de las preparaciones de DNA plasmidial, provino de Promega (Promega corporation, Madison, WI, EUA).

La purificación de los fragmentos provenientes de PCR y de digestión enzimática, a partir de geles de agarosa, fue realizada con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System obtenido de Promega.

Para la extracción de RNA se empleó TRIzol® Reagent obtenido de Invitrogen-Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

La reacción de transcripción reversa fue llevada a cabo con la transcriptasa inversa M-MLV obtenida de Invitrogen-Life Technologies.

La detección de las hormonas del crecimiento recombinantes fue realizada con anticuerpo poli-clonal anti-bGH elaborado en conejo con ayuda del Departamento de Inmunología de nuestra facultad y rastreado luego con un anticuerpo secundario anti conejo generado en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano, (PIERCE, Rockford USA)

El Kit GlycoProTM empleado en los ensayos de desglicosilaciones de GHs proviene de PROzyme® (San Leandro, CA, EUA).

C. Cultivo celular

La hormona de crecimiento recombinante fue obtenida de Genentech Inc. (San Francisco, CA, EUA). La prolactina humana fue obtenida de Lee BioSolutions Inc. (St Louis, MO, EUA) Suero fetal bovino, suero de cabra, factor de crecimiento epidérmico (EGF), LipofectamineTM, Opti-MEMTM I medium, medio Eagle modificado de acuerdo con Dulbecco-Vögt (DMEM) y RPMI de Invitrogen-Life Technologies. Insulina, d-biotina, transferrina humana, triiodothyronine, Oil Red O, dimethyl sulfoxido y albumina bovina (BSA), provienen de Sigma Chemical Co. El suero de gato y línea celular 3T3-L1 fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Walid Kuri-Harcuch (CINVESTAV-IPN, México).

La línea celular Nb2 fue proporcionada gentilmente por Dra. Carmen Clapp (UNAM-Juriquilla, México).

El material de cultivo celular: placas de cultivo de 60 mm, 100 mm, multiplatos de 24 pozos y 25 cm² cell culture flask, fueron obtenidos de Corning Incorporated (NY, USA)

D. Equipos e infraestructura

Los equipos utilizados fueron: un horno de microondas Panasonic modelo NNS-754WM, microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 (Brinkmann Instruments, Inc. NY EUA), fuentes de poder Thermo EC250-90 (Milford, MA, USA) centrífuga Beckman Allegra TM modelo X-22R, un agitador orbital VWR modelo DS500 (USA), congelador REVCO modelo ULT-1386 de Kendro Laboratory Products (Asheville NC, EUA), termomixer Eppendorf (Westbury, NY, EUA), y un baño de agua LABNET 6 Liter Water Bath (Woodbridge NJ, USA). La cuantificación del DNA, RNA y el seguimiento del crecimiento bacteriano y fueron efectuadas con un espectrofotómetro de la marca Beckman modelo DU® 530 (Westbury, NY, EUA). Los reactivos se almacenaron en un congelador marca Torrey (Monterrey, Mex). Las reacciones de PCR y RT-PCR semicuantitativos fueron realizadas en un termociclador marca Eppendorf Mastercycler gradient (Amburgo, Alemania) La balanza analítica fue de la marca OHAUS modelo AP110S, y la balanza granataria digital de la marca Sartorius modelo 1206MP (Göttingen, Alemania).

Los protocolos de cultivo celular fueron realizados en una campana de flujo laminar LABCONCO modelo Class II Safety Cabinet (Kansas city, Missouri, USA) y mantenidos en ambiente al 10% de CO₂ en una incubadora marca Sanyo modelo MCO-18AIC (Bunkyo, Tokyo, Japon) y analizados empleando un microscopio OLYMPUS modelo CKX41 con cámara fotográfica CAMEDIA modelo C-7070 acoplada al microscopio (Olympus corporation Htagaya, Tokyo, Japon). El conteo celular fue realizado mediante el empleo de cámaras Neubauer® (Neubauer, Marienfeld, Alemania).

El análisis electroforético fue realizado mediante el empleo de cámaras de electroforesis para mini geles de agarosa horizontal Thermo EasyCast™ B2 y Thermo EC120 para geles verticales de poliacrilamida (ThermoFisher USA).

El análisis estadístico fue realizado empleando el programa computacional Excel de Microsoft Office 2007, y el programa computacional SPSS 14 para Windows (SPSS®,

SPSS Inc., USA).

Los programas de análisis en Biología Molecular utilizados fueron: Amplify versión 1.2b (Bill Engels 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI, EUA), OLIGO versión 4.0 (© 1992 Wojciech Rychlik, National Bioscience Inc., Plymouth, MN, EUA) y el paquete de programas DNASTar (DNASTAR Inc., Madison, WI, EUA). y. Para la cuantificación del DNA y la determinación de los tamaños se utilizó el software LabWorks versión 4.5.00.0 (©1996-2003, Media Cybernetics, Inc.) y el equipo UVP Mini Darkroom de Bioimaging Systems (Upland, CA, EUA). Para la construcción de los vectores y el análisis de patrones de restricción, fue empleado el programa Vector NTI Suite 9 (Informax 2003, The University of North Carolina Shared BioInformatics Resource). Para el análisis densitométrico tanto de productos de PCR y proteicos se empleó el programa computacional GEL PRO 3.2 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Desde la internet fue empleado el programa computacional BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), NEBcutter 2.0 de New England Biolabs (<http://www.neb.com>) y ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) y el programa de predicción de genes GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) (Stanford University, USA).

5.2.- Métodos.

5.2.1.- Estrategia experimental.

El trabajo experimental involucró tres etapas:

- **BioInformática**

Los vectores Topo portadores de genes de GH-N de las especies a analizar en este trabajo, junto con sus secuencias nucleotídicas, fueron proporcionados por el Laboratorio de Genómica y Bioinformática

La identidad de los vectores fue confirmada mediante cortes con enzimas de restricción y por comparación de estos resultados con los obtenidos de los análisis bioinformáticos de las referidas secuencias.

Finalmente se definió, en base a sus secuencias, la mejor estrategia de subclonación de cada uno de las unidades transcripcionales de los genes en estudio, en el vector de

expresión eucariótico pcDNA3.1 Hygro +.

- **Biología molecular.**

Una vez definida la estrategia de subclonación, se procedió a subclonar las unidades transcripcionales de los genes de interés en el vector de expresión antes mencionado. Esto fue realizado mediante dos procedimientos:

- Subclonación directa mediante corte enzimático.
- Amplificación por PCR con oligonucleótidos portadores de sitios de restricción complementarios a los presentes en el vector de expresión.

Finalmente, la identidad de los vectores de expresión pcDNA3.1-GH fue confirmada por los patrones de restricción obtenidos al realizar digestión enzimática y en el caso de los vectores portadores de las UTs de mono Rhesus, mono araña y lémur, también por secuenciación nucleotídica.

- **Biología celular:**

Los vectores de expresión fueron empleados en ensayos de transfección en la línea celular HeLa. A partir de las células transfectadas se obtuvo RNA, cuyo análisis reveló el potencial transcripcional de cada uno de ellos.

De estas mismas células fue recolectado el medio de cultivo, para detectar la presencia de la hormona y emplearlo en los ensayo de actividad biológica.

5.2.2.- Técnicas de laboratorio.

5.2.2.a.- Análisis bioinformático

Las secuencias proporcionadas de los plásmidos recombinantes (basados en los vectores plasmídicos TopoXL y TopoTA), portadores de cada uno de los genes de GHs correspondientes a las especies analizadas en este trabajo, fueron comparadas con las secuencias presentes en las bases de datos en la internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Esto permitió determinar la identidad de cada una de ellas. Además, realizando comparaciones con la estructura predicha para el gen GH humano, se pudo determinar la secuencia correspondiente al mRNA principal para cada uno de los genes y la proteína esperada para su RNA mensajero, predicho mediante el

empleo del programa MegAlign de DNA Star.

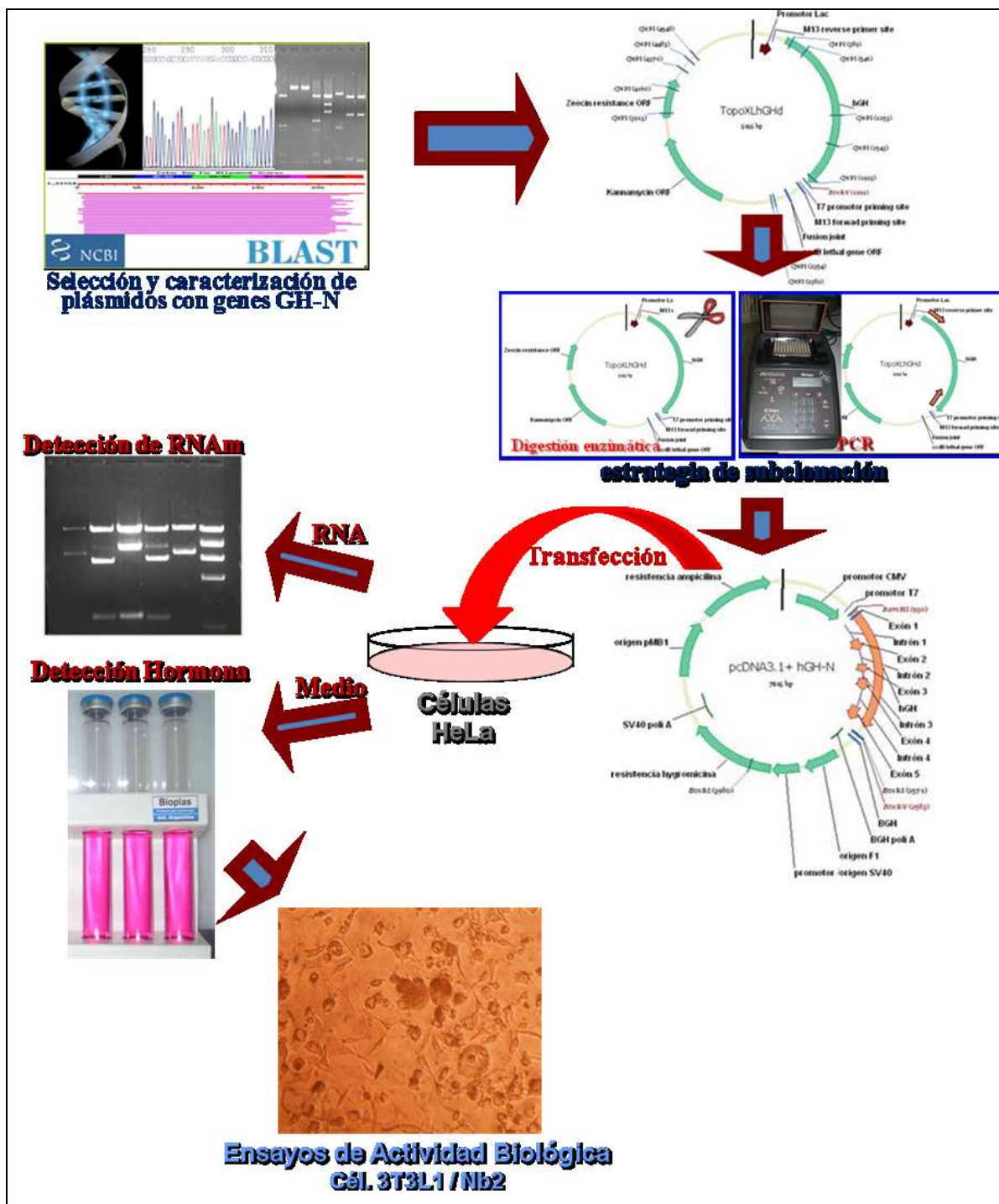


Figura 14: Estrategia experimental empleada. Abarca los experimentos de bioinformática, biología celular y biología molecular que integran el trabajo.

Por otra parte, las secuencias de los plásmidos portadores de las GH fueron analizadas mediante el programa computacional NEB cutter (www.neb.com). Esto nos permitió determinar los potenciales sitios de restricción a ser utilizados en la caracterización enzimática y, de igual forma, seleccionar aquellas enzimas que permitieran obtener el fragmento completo, para subclonar de manera dirigida la unidad transcripcional de los genes GHs en el vector de expresión para células eucariotas pcDNA 3.1 h+. En aquellos casos que la estructura del gen impidiera una estrategia de clonación dirigida, se desarrolló una estrategia alterna para clonar las unidades transcripcionales. Esta consistió en la amplificación del fragmento de interés mediante el empleo de oligos específicos y mutagénicos que introducen sitios de restricción complementarios a los presentes en el sitio de clonamiento múltiple del vector de expresión empleado.

5.2.2.b.- Producción de vectores a pequeña y mediana escalas.

Para aumentar la cantidad del material genético de trabajo, fueron transformadas bacterias DH5 α calcio competentes con 1 ng de las versiones recombinantes de los plásmidos Topo portadoras de las unidades transcripcionales de GHs, proporcionados por el Laboratorio de Genómica y Bioinformática. Las bacterias DH5 α -calcio competentes fueron preparadas de la siguiente forma: una colonia de bacterias fue inoculada en 4 ml de medio LB (bactotriton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%). Las bacterias fueron crecidas durante toda la noche a 37°C en agitación constante. Al día siguiente, fueron inoculados 0.5 ml del cultivo bacteriano en 50 ml de medio LB fresco y puestas a crecer a 37°C, con agitación constante hasta alcanzar una DO (densidad óptica) de 0.375 a 590 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, las bacterias fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 7 minutos. Luego de eliminado el sobrenadante, la pastilla bacteriana fue resuspendida en 10 ml de CaCl₂ frío. Posteriormente fueron sometidas a una nueva centrifugación a 2,500rpm durante 5 minutos. Luego de remover el sobrenadante fueron resuspendidas en 10 ml de CaCl₂ frío y mantenidas en hielo durante 30 minutos. Alícuotas de 200 μ L fueron preparadas al término del procedimiento.

Para la transformación fueron empleadas 200µl de bacterias, las cuales fueron incubadas en presencia del vector durante 30 min. a una temperatura de 4°C. Posteriormente se realizó un choque térmico durante 1 min. a una temperatura de 42°C seguido inmediatamente a una incubación en hielo. Para recuperar las bacterias del choque térmico se agregaron 800µl de medio LB y se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37°C. Finalmente, las bacterias fueron empastilladas mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 5 minutos, eliminado el sobrenadante y resuspendiéndolas en 200 µl de medio LB, para finalmente ser sembradas en placas de Petri conteniendo medio LB-Agar con antibiótico kanamicina como medio de selección.

Aquellas colonias presentes luego de la incubación de las placas durante toda la noche a 37°C, fueron crecidas en 4 ml (pequeña escala) o 50 ml (mediana escala) de medio de selección (LB-antibiótico).

5.2.2.c.-Análisis de clonas recombinantes.

5.2.2.c.1.-Extracción de DNA plasmídico

La selección de las clonas recombinantes fue realizada mediante el análisis de la presencia del inserto correspondiente al gen de interés. Para ello se crecieron colonias en medio LB, en presencia de kanamicina (50 µg/mL) como antibiótico de selección, a 37°C con agitación continua durante toda la noche. Al día siguiente, 3.5 mL de medio fueron centrifugados durante 2 min. a 14,000rpm, removido el medio por aspiración y mantenidos en hielo hasta el momento de realizar la extracción de DNA plasmidico. El DNA plasmídico se extrajo por el método de la lisis alcalina (Sambrook J y cols, 1989). Las células fueron resuspendidas en 150 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) con el vortex. Se agregaron 300 µl de solución II (preparada en fresco mezclando 0.2 ml de NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10% y 8.8 ml de agua), se mezcló inmediatamente por inversión y se incubó en hielo por 5 min. Pasado este tiempo, se agregaron 225 µl de solución III (acetato de amonio 7.5 M), se mezcló por inversión y se incubó por 5 min en hielo. El tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, donde se le hizo una extracción fenol/sevag (½ volumen de fenol y ½ volumen de sevag). Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 2 min. y el sobrenadante se transfirió a un tubo donde el DNA plasmídico se precipitó con 0.8

volúmenes de isopropanol al 100% frío. Después de centrifugar a 14,000 rpm por 2 min, la pastilla se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% frío y se dejó secar al aire y a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente fueron resuspendidas en 50 µl de TE 1 X con 1U de RNAsa One para eliminar el RNA presente en las muestras.

5.2.2.c.2.- Selección de las clonas recombinantes

Los plásmidos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, utilizando como marcador de peso molecular al bacteriófago λ digerido con la enzima de restricción *Pst* I, y cuantificados mediante el empleo del espectrofotómetro leyendo a las longitudes de onda de 260 y 280nm. Cada clona fue digerida con la enzima de restricción *Pst* I, que fragmenta la unidad transcripcional de las diferentes GHs con patrones característicos. Una segunda caracterización fue realizada mediante el empleo de mezclas enzimáticas que permitieran una caracterización adicional de los vectores proporcionados, siendo la enzima empleada en este caso *EcoRI*.

5.2.2.d.- Subclonación de unidades transcripcionales: Construcción de plásmidos.

5.2.2.d.1.- Subclonación directa

La unidad transcripcional (UT) de la GH del humano y del lémur (*Lemur catta*) fueron obtenidas mediante cortes con las enzimas *BamH* I –*EcoR* V (figura 15) y *BamH* I –*Ale* I (figura 16) respectivamente. En el caso de lémur, la enzima de restricción *Ale* I presenta corte complementario con la enzima de restricción *EcoR* V (ver figura 16). Los fragmentos portadores de las unidades de transcripción fueron insertados en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro+ digerido con las mismas enzimas de restricción.

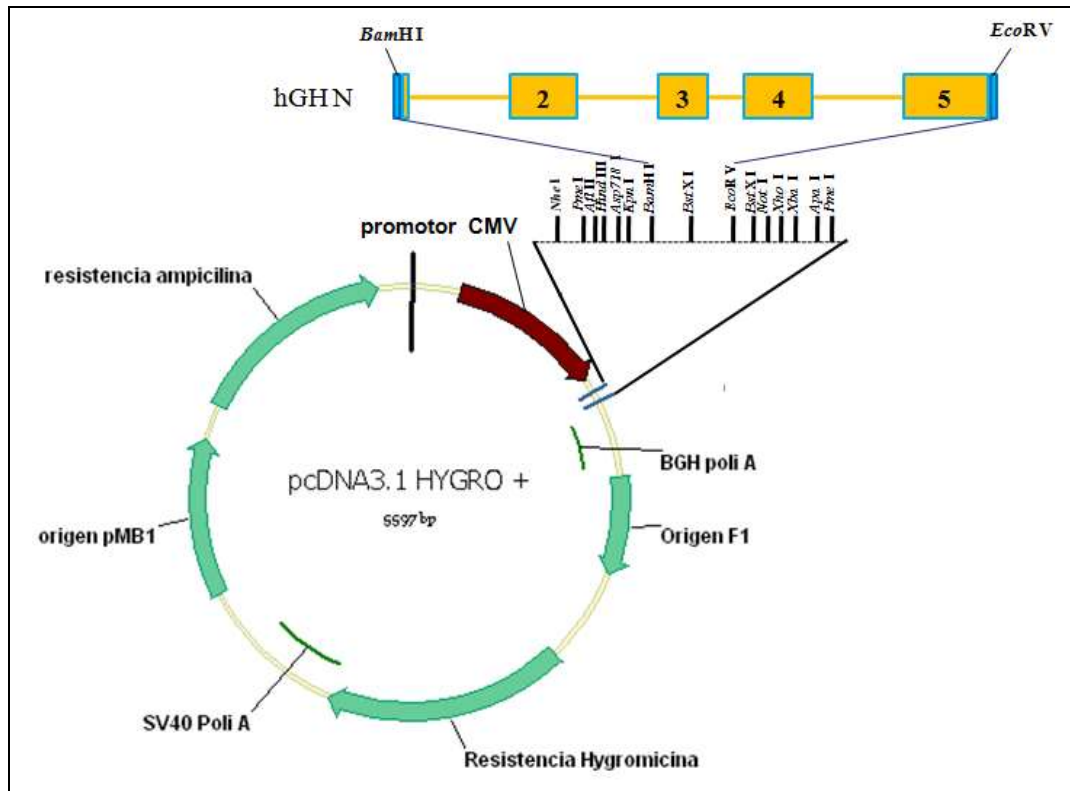
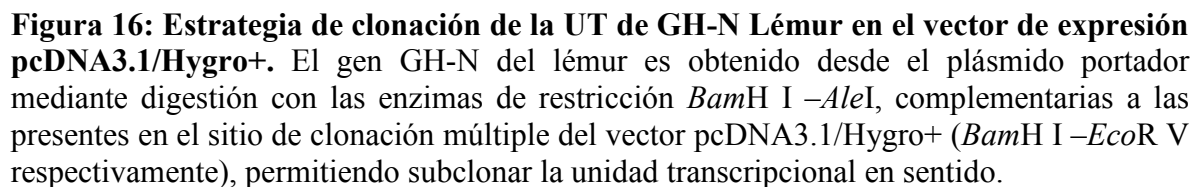


Figura 15: Estrategia de clonación de la unidad transcripcional (UT) de hGH en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro+. El gen hGH es obtenido desde el plásmido portador mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*H I –*Eco*R V, complementarias a las presentes en el sitio de clonación múltiple del vector pcDNA3.1/Hygro+, permitiendo subclonar la unidad transcripcional en frente del promotor CMV.



33

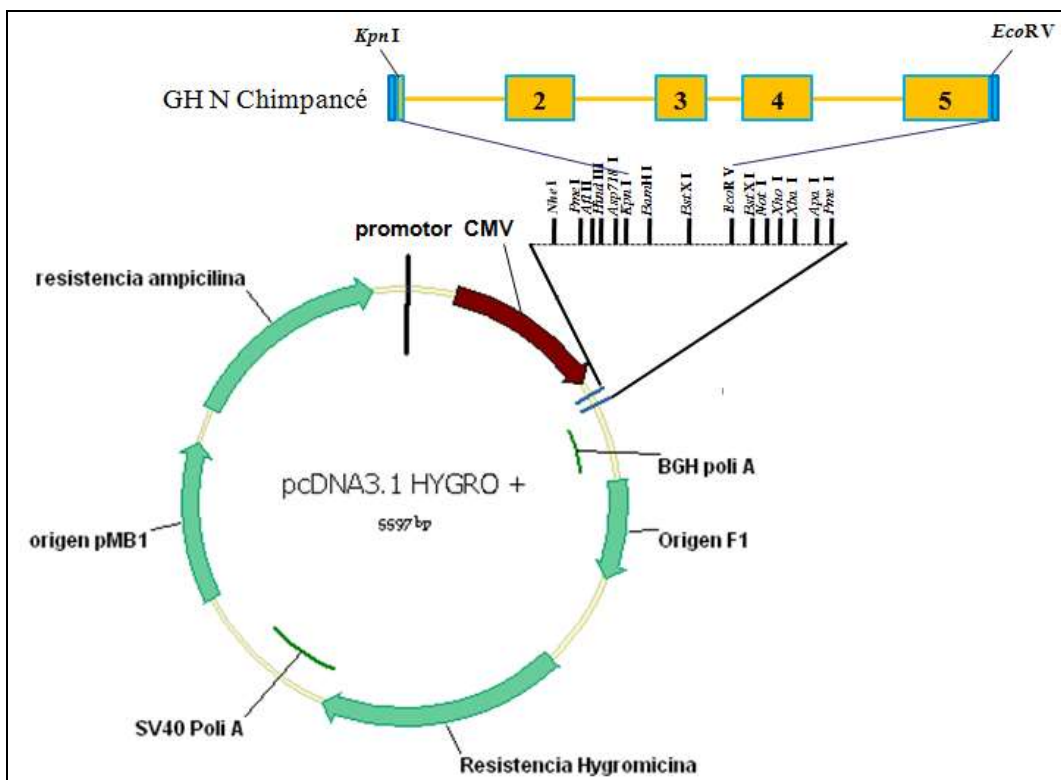


Figura 17: Estrategia de clonación de la UT de GH-N del chimpancé en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro+. El gen GH-N del chimpancé es obtenido desde el plásmido portador mediante digestión con las enzimas de restricción *KpnI* –*EcoRV*, complementarias a las presentes en el sitio de clonación múltiple del vector pcDNA3.1/Hygro+, permitiendo subclonar la unidad transcripcional en sentido.

5.2.2.d.2.- Subclonación mediante PCR

Los genes de GH-N de gorila (*Gorilla gorilla*), mono araña (*Atheles geoffroyi*) y mono rhesus (*Macaca mulatta*) fueron obtenidos mediante PCR con los iniciadores consenso que permitieron obtener sus UTs y agregar sitios de corte complementarios a los existentes en el vector de expresión (cuadro 2, figura 18), empleando como molde los vectores Topo portadores de cada uno de los genes. La amplificación fue realizada en un volumen final de 25 μ L que contenía 0.08 μ M de cada iniciador, 1 Unidad de Taq DNA Polimerasa recombinante (Fermentas), amortiguador Fermentas para Taq Polimerasa recombinante [10X Taq buffer con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – MgCl_2 , 750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% (v/v) y Tween 20], además de 4mM MgCl_2 , 0.1mg/mL de BSA, los 4 desoxinucleótidos (0.2 mM de cada uno) y 10 ng de DNA plasmidial. La reacción de amplificación fue realizada bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°

durante 5 min, más 35 ciclos, cada uno de los cuales consta de: 94°/40s, 66°/40s y 72°/1.5 min, mas una incubación final a 72° durante 10min. El producto de PCR fue clonado en el vector TopoTA, caracterizado mediante cortes con enzimas de restricción y secuenciado en ambas direcciones empleando los iniciadores M13 (sentido: GTAAAACGACGGCCAG; antisentido: CAGGAAACAGCTATGAC).

Cuadro 2: Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de diferentes GHs.

NOMBRE	SECUENCIA de 5'a 3'	ESPECIE
5GHPRIMK	attaagggtaccgtggacagctcacctag	todas
5KpnI Rhesus	tggacgggtaccctagctgcaatggctgcagg	sólo Rhesus
3GHPRIMEX	cctcgagatatcctagaagccacagct	todas

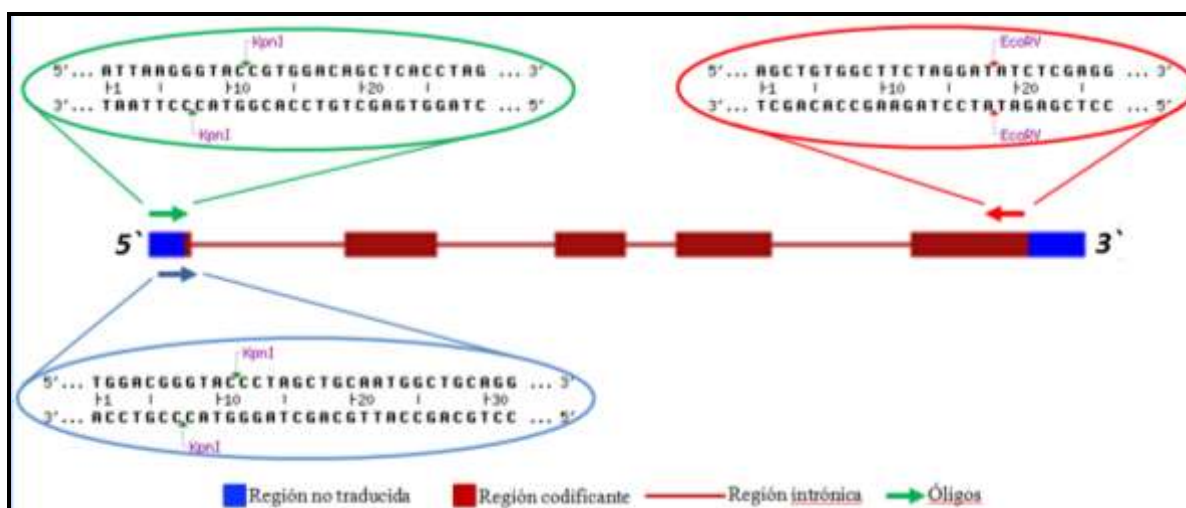


Figura 18: Amplificación por PCR de UT de GH. Se representa la estructura de la unidad transcripcional de las GHs y los sitios de unión de los oligonucleótidos empleados para su amplificación. Además se indican los sitios de restricción agregados por los oligonucleótidos al amplicón.

Finalmente las unidades transcripcionales correspondientes a la GH-N de gorila, mono araña y mono Rhesus, fueron digeridas con las enzimas *KpnI*- *EcoRV* y los fragmentos fueron subclonados en el vector de expresión pcDNA3.1/Hygro+ digerido con la mismas enzimas de restricción (figura 19).

5.2.2.f.- Determinación de variantes de los RNAm.

5.2.2.f.1- RT-PCR:

El RNA fue extraído de las células HeLa transfectadas, mediante el empleo de TRIzol®, siguiendo la instrucciones del fabricante (Invitrogen). A partir de 4 µg de RNA total se realizó la síntesis de cDNA mediante el empleo de la transcriptasa reversa de MMLV, empleando como iniciador a un oligo-dT. La determinación de isoformas de mensajeros de GH fue realizada mediante PCR, empleando 1µL de cDNA como molde. La amplificación fue realizada en un volumen final de 25 µL que contenía 0.1 µM de cada iniciador, 1 Unidad de DNA Polimerasa recombinante (Fermentas), 1X amortiguador Fermentas para esta enzima [10X Taq buffer with (NH₄)₂SO₄ – MgCl₂: 750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20], 4mM MgCl₂, 0.1mg/mL de BSA, los cuatro desoxinucleótidos (0.2 mM de cada uno) y 10 ng de DNA plasmídico. Los oligos y el programa de PCR empleado en cada uno de los casos son detallados en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3: Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de los cDNAs correspondientes a las diferentes GHs analizadas.

NOMBRE	SECUENCIA de 5' a 3'	ESPECIE
5GHPRIMK	attaagggtaccgtggacagctcacctag	Todas
5KpnI cDNARhe	tggacgggtaccctagctgcaatggctgcag	sólo Rhesus
3GHPRIMEX	Cctcgagatatcctagaagccacagct	Todas

Cuadro 4: Programas empleados en la amplificación por PCR de los cDNAs correspondientes a las GH-N analizadas en este trabajo.

		GH-N	GH-N Rhesus/Lemur
1.	Desnaturación inicial	95°C por 5 min.	95°C por 5 min.
2.	35 ciclos	95°C por 40 seg. 66°C por 40 seg. 72°C por 1 min.	95°C por 40 seg. 60°C por 40 seg. 72°C por 1 min.
3.	Extensión final	72°C por 10 min.	72°C por 10 min.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) para obtener una mejor resolución en los patrones de migración electroforética de cada producto.

5.2.2.f.2.- Hibridación tipo Northern:

Empleando 20 µg de RNA total, previamente desnaturalizado en amortiguador de muestra (conteniendo 50% formamida desionizada, 5% formaldehído y 1X MOPS), se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) Formaldehído al 5%, para posteriormente transferir el RNA así resuelto a una membrana de Nylon Hybond-N+ (Amersham Bioscience) y fijado mediante el empleo de luz ultravioleta (120 mJoules).

La hibridación, el marcado de 500 ng de sonda y la detección por quimio luminiscencia con CDP-StarTM (Amersham Bioscience), fue realizada mediante el empleo del sistema de marcado directo y detección “Gene Images Alkphos” según las instrucciones del fabricante (Amersham Bioscience).

5.2.2.f.3.- Diseño de sonda.

Para el diseño de la sonda fue seleccionada la secuencia nucleotídica más conservada de todas las analizadas en este trabajo. Para ello fueron alineadas las secuencias de las unidades transcripcionales de las GHs mediante el empleo del programa computacional ClustalW y elegida la secuencia correspondiente a los exones 4 y 5 del cDNA de Gorila (figura 20). Esta región fue amplificada mediante PCR utilizando los iniciadores sentido IGP IV (5`aac gta gac ccg cac cgc atc tcc ctg c 3`) y anti sentido D10 (5`gaa gca gga gag cag ccc gta gtt 3`). La amplificación fue realizada en un volumen final de 25 µL, empleando como molde de la reacción el cDNA de gorila. La mezcla de reacción contenía 0.08 µM de cada iniciador, 1 Unidad de DNA Polimerasa Taq recombinante (Fermentas), 1X amortiguador Fermentas, 4mM MgCl₂, 0.1mg/mL de BSA y los cuatro desoxinucleótidos (0.2 mM de cada uno). Las condiciones empleadas para la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 94° durante 5 min., más 35 ciclos, cada uno consta de: 94°/40s, 60°/40s y 72°/1.0 min., más una incubación final a 72° durante 10 minutos.

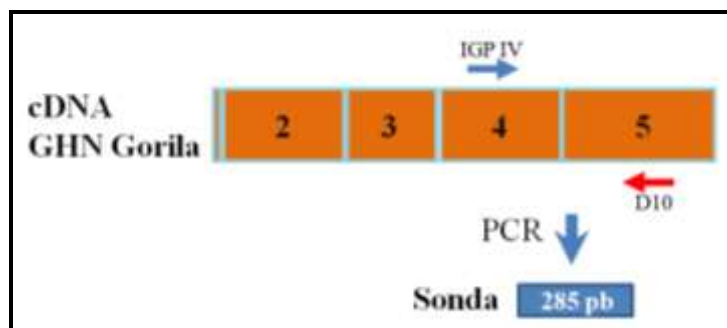


Figura 20: Obtención por PCR de sonda para Northern Blot. En la figura se representa la estructura del cDNA principal correspondiente a la GH-N del gorila y los sitios de unión de los oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de la sonda empleada en la detección de isoformas de mensajeros.

El producto de PCR de 285 pb fue resuelto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X, purificado desde el gel mediante el empleo de kit WIZAR® y finalmente cuantificado en espectrofotómetro.

5.2.2.g.- Determinación de isoformas proteicas.

Alícuotas de 500 µL de medio de cultivo obtenido del protocolo de transfección, fueron precipitadas con metanol/cloroformo, para posteriormente resuspender la pastilla seca en amortiguador de muestra (1X SDS, 0.25% β-mercaptoetanol, 0.03% p/v azul de bromofenol) y desnaturalizarla por calor a 95°C por 5 minutos. Las proteínas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), y transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

A) Inmunodetección tipo Western.

El bloqueo de la membrana de nitrocelulosa fue realizado mediante incubación con agitación por dos horas con amortiguador PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄ pH 7.4) suplementado con 5% de leche descremada. Las membranas fueron incubadas toda la noche con una dilución 1:1000 del anticuerpo polyclonal anti-bGH, obtenidos de conejo, en solución de bloqueo, a 4°C. Al término de este procedimiento, las membranas fueron lavadas seis veces con 0.1 % PBS-TWEEN-20, e incubadas con un anticuerpo secundario anti conejo obtenido de cabra y conjugado con peroxidasa de rábano (PIERCE) 1:15,000, diluido en la solución de bloqueo. Las

membranas fueron lavadas nuevamente y los complejos inmunes fueron detectados por quimio luminiscencia (Supersignal west pico chemiluminescence Kit), según las instrucciones del fabricante (PIERCE). Los datos fueron analizados con Gelpro32 para la determinación de peso molecular de las proteínas recombinantes obtenidas.

B) Ensayo de desglicosilación

Las proteínas presentes en alícuotas de 500 μ L de medio de cultivo obtenido del protocolo de transfección, fueron precipitadas (por triplicado) con methanol/cloroformo, resuspendidas en 35 μ L agua desionizada y 10 μ L de 5X amortiguador de incubación (PROzyme®). Posteriormente fueron tratadas de manera independiente con 1 μ L de N-Glicanasa (≥ 5 U/mL), 1 μ L de Sialidasa A (≥ 5 U/mL) y 1 μ L de O-Glycanasa (≥ 1.25 U/mL), durante 3 días a 37°C, o de manera acumulativa agregando 1 μ L de de enzima, incubando 3 días a 37°C y recolectando 15 μ L de muestra para análisis en gel antes de agregar la siguiente enzima. Al término de la incubación, 15 μ L de muestras proteicas tratadas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE), transferidas a una membrana de nitrocelulosa, y sometidas a inmunoblot para analizar el efecto de las desglicosilaciones sobre las GHs.

5.2.2.h.- Ensayos de actividad biológica:

La actividad biológica de las diferentes hormonas en estudio fue inferida por la capacidad de promover conversión adiposa en la línea celular 3T3-L1 de preadipocitos murinos (Morikawa *y cols.*, 1982), o por su capacidad promotora de proliferación sobre la línea celular Nb2 de linfoma de rata (Lawson *y cols.*, 1982).

A) Conversión adiposa:

La línea celular de preadipocitos 3T3-L1 (Green y Kehinde, 1976) fue sembrada a una densidad de 700 células/cm². Tres días posterior a la siembra, los cultivos fueron alimentados con DMEM suplementado con 4%(v/v) de suero de gato, 5 μ g/mL insulina, y 1 μ M d-biotina (medio no adipogénico) (Kuri-Harcuch y Green, 1978), y alimentados nuevamente cada dos días. Uno o dos días post confluencia los cultivos fueron estimulados a diferenciación reemplazando el medio de siembra por medio DMEM suplementado con

2%(v/v) de suero de gato, 0.2% suero de ternera, 5 µg/mL insulina, 5 µg/mL transferrina, 1µM d-biotina, 2nM triiodotironina, 40 µM 2-mercaptoethanol y 0.01 ng/ml EGF (medio definitivo no adipogénico) (Morikawa y cols., 1984) más 20-60 ng/mL hGH como control positivo, y con similares cantidades de GH correspondiente a los sobrenadantes obtenidos a partir de cada ensayo de transfección (medios adipogénicos). Para este efecto la concentración de GH presente en los medios de cultivos fue estimada mediante el análisis densitométrico de las bandas proteicas detectadas por Western blot, realizado con el programa computacional Gel Pro 3.2, considerando sólo a aquellas isoformas que presentaron patrones de migración electroforética correspondiente a monómeros de GH. Estos resultados fueron correlacionados con el análisis densitométrico efectuado para la hGH-N, y con las concentraciones detectadas para esta misma obtenida por RIA.

La conversión adiposa fue determinada por cambios morfológicos de las células en cultivo, evidenciada por la formación de grupos de adipocitos con gotas de lípidos en su interior. Los resultados corresponden al promedio obtenidos de los triplicados de cada experimento. Los cultivos fueron mantenidos en incubación a 37°C en una atmósfera al 10% CO₂.

- **Validación de la conversión adiposa por RT-PCR semicuantitativa de marcadores génicos.**

Esta validación se practicó mediante la cuantificación de marcadores de diferenciación adiposa mediante RT-PCR semicuantitativo (Rodriguez y cols., 2004). Transcurridas 144 horas de ser sometidas al protocolo de diferenciación adiposa, el RNA fue extraído de las células 3T3-L1 mediante el empleo de Trizol. A partir de 4 µg de RNA total se realizó la síntesis de cDNA mediante el empleo de la transcriptasa reversa de MMLV, empleando como iniciador a un oligo-dT. El análisis de los marcadores de diferenciación adiposa PPAR γ , LPL (lipoprotein lipasa) y el gen de referencia 36B4 fue realizado empleando 1µL de cDNA como molde en la reacción de PCR. Los oligos utilizados en cada uno de los casos y el programa de PCR empleado en la obtención de los diferentes productos son detallados en los cuadros 5 y 6.

Cuadro 5: Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de los marcadores de diferenciación adiposa.

NOMBRE	SECUENCIA de 5' a 3'	GEN
UP- 36 B4	aggccctgcactctcgctttctgg	36B4 House keeping
LP- 36 B4	tgggtgctttggcgggattagtcg	
UP- PPARG	aggcgaggcgcatcttgacag	PPAR γ
LP- PPARG	agggcctccgcagggttttga	
UP- LPL	gtatcgggccagcaacattatcc	LPL (lipoprotein lipasa)
LP-LPL	gctttgctggggttttctcattca	

Cuadro 6: Programas empleados en la amplificación por PCR de los marcadores de diferenciación adiposa.

		36B4	PPAR γ	LPL
1.	Desnat. inicial	95°C por 5 min.	95°C por 5 min.	95°C por 5 min.
2.	ciclos	95°C por 40 seg. 66°C por 40 seg. 72°C por 1 min. } 20 ciclos	95°C por 40 seg. 62°C por 40 seg. 72°C por 1 min. } 26 ciclos	95°C por 40 seg. 62°C por 40 seg. 72°C por 1 min. } 24 ciclos
3.	Extensión final	72°C por 10 min.	72°C por 10 min.	72°C por 10 min.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v) y analizados densitométricamente mediante el empleo del programa computacional GEL PRO 3.2. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de Varianza, utilizando para este efecto el paquete de análisis estadístico SPSS.

B) Proliferación:

La línea celular Nb2 fue mantenida en DMEM suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (FBS), 10% suero de caballo (HS), 10 μ M 2-mercaptoethanol, 50 U/mL penicilina y 50 μ g/mL streptomycin. Luego fueron arrestadas por incubación en medio DMEM suplementado con 1%FBS y 10% HS, durante 18 horas.

Para iniciar la proliferación celular, 50,000 células fueron sembradas y estimuladas con medio de cultivo suplementado con las hormonas recombinantes obtenidas del protocolo de transfección en células HeLa a una concentración final aproximada a

0.001nM, calculada de la misma forma que en el ensayo de conversión adiposa.

El ensayo fue montado en placas de cultivo de 24 pozos, empleando como control negativo medio sin GH, y como tratamientos:

- medio suplementado con sobrenadante de células HeLa sometidas al protocolo de transfección sólo con lipofectamina;
- medio suplementado con sobrenadante del protocolo de transfección con vector de expresión sin GH (Mock);
- medio suplementado con hormonas recombinantes obtenidas del protocolo de transfección con vector de expresión GH;
- como control positivo del ensayo fue empleado medio suplementado con Prolactina humana comercial (hPRLc).

La actividad promotora del crecimiento fue evaluada por conteo del número de células totales mediante el empleo de cámara Neubauer. Los bioensayos fueron realizados por triplicado, y mantenidos durante 72 horas en incubación a 37°C en una atmosfera al 10% CO₂.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

6.1.- Análisis bioinformático

A.- Genes:

Los genes de cada una de las GHs comprendidas en el presente estudio fueron obtenidos de la genoteca del Laboratorio de Genómica y Bioinformática de la U.L.I.E.G. Con el fin de corroborar su identidad, sus secuencias fueron comparadas con las de sus contrapartes disponibles en el GenBank, empleando el programa computacional Blast. En los casos particulares del lémur (*Lemur catta*) y gorila (*Gorilla gorilla*), cuyos genes GH son un descubrimiento inédito y reciente de nuestro grupo (y por ende no están aun disponibles en banco de datos alguno en el mundo), se consideró identidad si la unidad transcripcional en cuestión presentaba similitud con genes integrantes de la familia GH de otras especies de primates (cuadro 7).

Cuadro 7: Resultados de la comparación de las secuencias génicas de GHs.

Especie	Contraparte en el GenBank	Número acceso	* Max. Score (bits)	** E Value
Humano	Homo sapiens growth hormone 1 (GH1) gene, complete cds...	EU421712.1	2753	0.0
Chimpancé	Pan troglodytes growth hormone (GH-N) gene, complete cds	AF374232.1	2758	0.0
Gorila ^A	Pan troglodytes growth hormone (GH-N) gene, complete cds	AF374232.1	1463	0.0
	Homo sapiens growth hormone 1 (GH1) gene, complete cds, alternatively spliced	EU421712.1	1449	0.0
Mono Rhesus	Macaca mulatta growth hormone 1 (GH-1)...	DQ002799.1	2758	0.0
Mono Araña	Ateles geoffroyi growth hormone (GH-N) gene, complete cds	AF374234.1	2711	0.0
Lémur ^B	Galago senegalensis growth hormone, complete cds	AF292938.1	1379	0.0
	Otolemur crassicaudatus growth hormone gene, partial cds	AF319878.1	1050	0.0
	Nycticebus pygmaeus gene for growth hormone, exons 1-5	AJ297562.1	755	0.0

A= Comparación de la secuencia de gorila con las secuencias GH-N de humano y chimpancé en la base de datos GenBank.; B= Comparación de la secuencia de lémur con las secuencias de GH-N pertenecientes a tres especies de primos. * Max Score (bits): valor que indica cuán bueno fue el resultado de la alineación. Valores altos indican una mejor alineación entre secuencias. ** E Value: describe el número de aciertos originados por el azar que uno espera ver al buscar en una base de datos. Indica la importancia estadística de la alineación de una pareja de secuencias; refleja el

tamaño de la base de datos y el sistema de anotación empleado. Valores de E cercanos a cero indican “acierto más significativo”

Una vez confirmada la identidad de cada uno de los genes, se realizó el alineamiento de cada una de sus secuencias nucleotídicas utilizando el programa computacional MegAling. La comparación realizada entre ellas, utilizando el método de Clustal, permitió observar que la **mayor similitud** se encontraba entre las secuencias correspondientes a grandes monos (chimpancé y gorila) y humano, dato presentado en el eje horizontal en la figura 21.

En cuanto al porcentaje de divergencia se refiere, el programa MegAling lo calcula comparando las secuencias en base a la relación filogenética existente entre ellas (eje vertical figura 21). En este caso nuevamente se observa que las secuencias que presentan una **menor divergencia** respecto a la humana son las correspondientes a grande monos.

Porcentaje de identidad								
Divergencia	1	2	3	4	5	6		
	1		97.8	95.2	91.5	85.1	56.2	1
	2	2.2		95.1	91.4	85.6	56.8	2
	3	2.2	2.3		89.9	82.4	52.8	3
	4	6.5	6.4	6.4		82.7	54.6	4
	5	11.3	11.0	11.1	12.4		50.7	5
	6	30.9	30.4	29.2	32.5	33.1		6
	1	2	3	4	5	6		

1. hGH

2. Chimpanceé

3. Gorila

4. M. Rhesus

5. M. Araña

6. Lémur

1. hGH
2. Chimpancé
3. Gorila
4. M. Rhesus
5. M. Araña
6. Lémur

Figura 21: Similitud entre secuencias génicas de GHs. Se muestran los resultados en porcentaje de identidad y divergencia obtenidos de la comparación de las secuencias mediante el método de Clustal, empleando el programa computacional MegAling.

Observando las secuencias nucleotídicas alineadas, resultó obvio que la mayoría de las diferencias se ubican en las regiones no traducibles e intrónicas de cada una de las unidades transcripcionales (figura 22).

B.- RNA mensajeros

Utilizando el programa computacional GENSCAN se pudo observar la presencia de los sitios de empalme (splicing; el normal y el alternativo) que permiten generar la isoforma

principal del RNAm de cada uno de los genes. Por otra parte, comparando el resto de las secuencias contra la secuencia del gen hGH-N, fue posible detectar en los primates la presencia de potenciales sitios de empalme alternativo que, como en el caso de la primera, pueden eventualmente generar en cada una de dichas especies, isoformas de menor tamaño (cuadro 8).

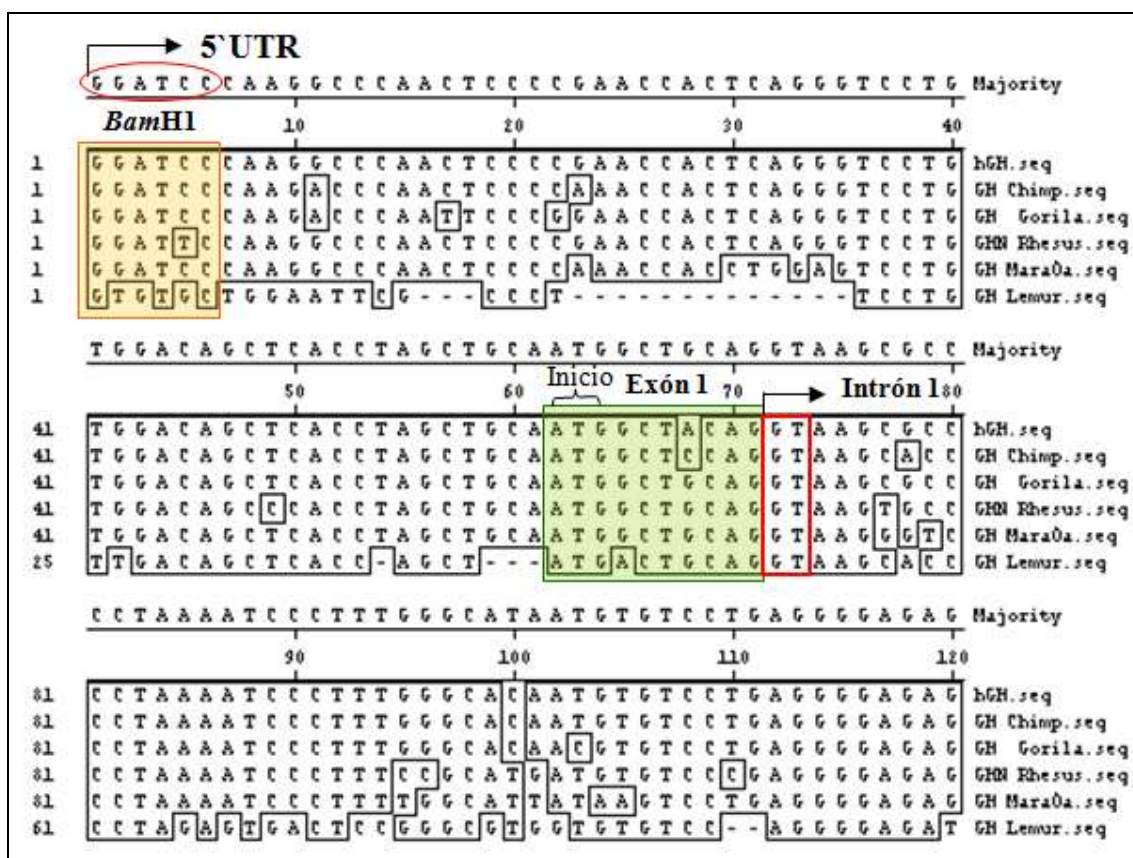


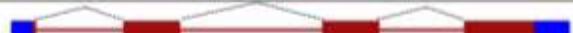







Figura 22: Comparación entre secuencias génicas de GHs. Se muestran parte de los resultados obtenidos de la comparación de las secuencias alineadas mediante el método de Clustal, empleando el programa computacional MegaAling. En recuadros negros se destacan los cambios nucleotídicos experimentados por las secuencias; en recuadro rojo con relleno es indicado el sitio de restricción *Bam*H1; en recuadro verde con relleno es indicado el exón 1 de los genes; en recuadro rojo se destaca el sitio donador de “splicing”; 5'UTR corresponde a la región 5' no traducible.

Cuadro 8: Especies de mensajeros descritos para hGH-N.

Isoforma	Tipo de empalme	Polipéptido	N° acceso
1		217	NM_000515.3
2		202	NM_022559.2
3		177	NM_022560.2
4		122	NM_022561.2
5		30	NM_022562.2

 Región no traducida
  Región codificante
  Región eliminada por empalme

* Incluye a los dos principales y a otros mencionados en algunos reportes.

Considerando las especies de RNAm principales y realizando un nuevo alineamiento empleando el método de Clustal, se confirmó que la mayor similitud se encontraba entre las secuencias correspondientes a grandes monos (chimpancé y gorila) y humano (figura 23).

Porcentaje de identidad							
Divergencia	1	2	3	4	5	6	
	1	97.9	98.6	96.2	90.7	74.3	1. hGH
	2	2.2	97.9	96.3	91.4	73.6	2. Chimpancé
	3	1.4	2.2	96.2	91.1	75.3	3. Gorila
	4	3.9	3.8	96.2	90.8	73.4	4. M. Rhesus
	5	9.5	8.8	9.3	90.8	72.2	5. M. Araña
	6	24.2	24.6	22.8	25.1	26.6	6. Lémur
	1	2	3	4	5	6	

Figura 23: Similitud entre secuencias de RNAm de GHs. Generado como es indicado en el caso de la fig. 21, excepto que son empleadas las secuencias de los RNAm predichas de las GHs en estudio.

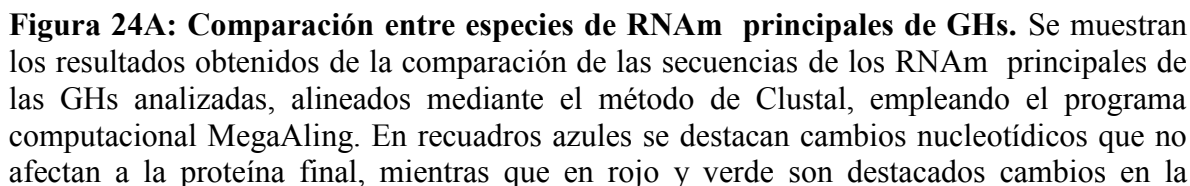
Este grado de semejanza es incluso mayor que el observado al comparar los genes (cuadro 9), datos que correlacionan con el resultado del análisis de divergencia, en el que se puede observar una disminución en los porcentajes obtenidos en cada caso (eje vertical figura 23).

Cuadro 9: Comparativa del grado de similitud entre transcritos primarios y RNAm maduros.

Identidad (%) respecto a hGH	Gen	cDNA
GH-N Chimpancé	97.8	97.9
GH-N Gorila	95.2	98.6
GH-N Rhesus	91.5	96.2
GH-N M.Araña	85.1	90.7
GH-N Lemur	56.2	74.3

El análisis detallado de la secuencia del RNAm de mono Rhesus (MVM) revela que su porcentaje de identidad aumenta notoriamente, siendo esto también observado para el mono araña (mono del nuevo mundo) y mayormente reflejado en caso del lémur (prosimio) (figura 23). Esto confirma la observación inicial sobre mayores diferencias presentes en las regiones intrónicas de cada uno de los genes, las cuales no están representadas en los RNAm (ver figura 23 y cuadro 9).

Las comparaciones codón por codón entre los RNAm revelan una serie de cambios equivalentes unos a mutaciones silenciosas y otras a mutaciones de sentido equivocado, que respectivamente pueden o no verse reflejados en la estructura primaria de la proteína (figura 24).



secuencia nucleotídica que originan un cambio en el residuo aminoacídico correspondiente.

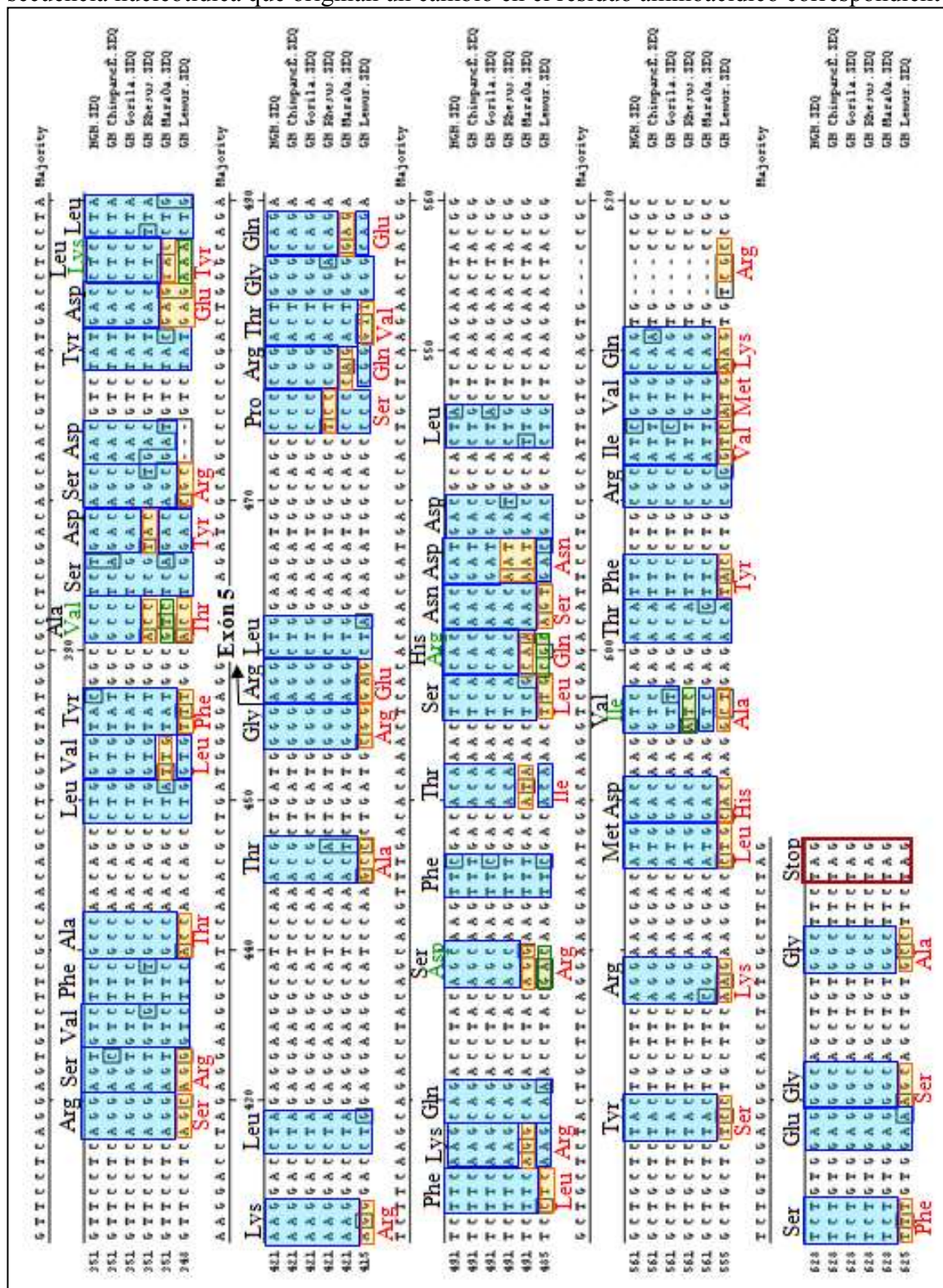


Figura 24 B: Continuación de la comparación de las secuencias nucleotídicas de los RNAm de las GH-Ns.

C.- Proteínas

Al efectuar el alineamiento mediante el método de Clustal de las proteínas, incluyendo las porciones correspondientes a sus respectivos péptidos señales, obtenidas al traducir el RNAm principal predicho para cada una de las secuencias analizadas, se observa nuevamente el alto grado de similitud presente entre las secuencias polipeptídicas correspondientes de las GHs de los grandes monos (chimpancé y gorila); ambas con un 99.1% de similitud respecto de la versión del humano. En cuanto a los restantes polipéptidos analizados, para mono rhesus (mono del viejo mundo) el porcentaje de identidad es notoriamente mayor que el observado en mono araña (mono del nuevo mundo) y lémur (prosimio), pero inferior al correspondiente a grandes monos (figura 25).

Porcentaje de identidad							
Divergencia	1	2	3	4	5	6	
	1	99.1	99.1	95.9	89.0	62.7	1
	2	0.5	98.6	95.9	89.0	62.7	2
	3	0.5	0.9	95.4	88.5	63.1	3
	4	3.8	3.8	4.3	89.0	62.7	4
	5	11.5	11.5	12.0	11.5	60.4	5
	6	42.6	42.6	41.8	42.6	46.7	6
	1	2	3	4	5	6	

1. hGH

2. Chimpancé

3. Gorila

4. M. Rhesus

5. M. Araña

6. Lémur

Figura 25: Similitud entre polipéptidos GHs. Se muestran los porcentajes de identidad y de divergencia obtenidos de la comparación de las secuencias aminoacídicas de cada una de las GHs analizadas en este trabajo, mediante el método de Clustal, empleando el programa computacional MegaAling.

Si se toman en cuenta en un nuevo análisis las secuencias correspondientes a las GHs de otros vertebrados, como es el caso del perro (*Canis lupus familiaris*) y cerdo (*Sus scrofa*), incluyendo prosimios como el gálgalo (*Nycticebus pygmaeus*), podemos observar dos grandes grupos (figura 26):

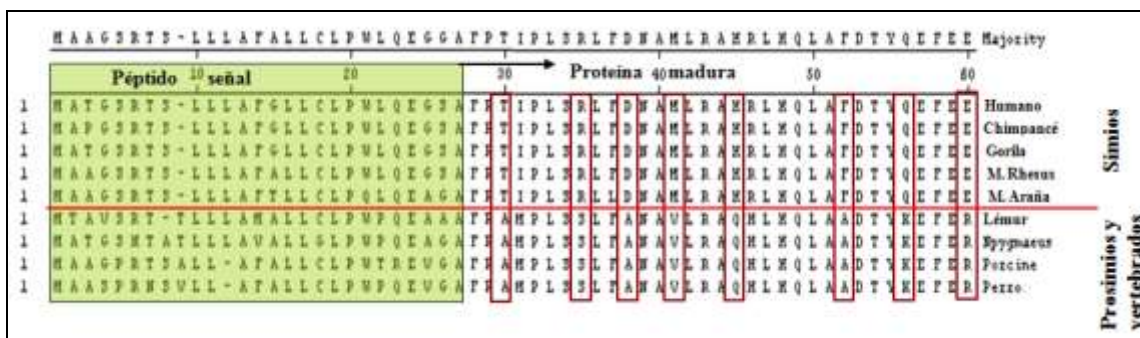


Figura 26: Comparación de secuencias aminoacídicas de GHs de diferentes especies de vertebrados. Se destacan los cambios aminoacídicos comunes entre secuencias de GHs pertenecientes a simios, prosimios y vertebrados, estos últimos localizados en el mismo grupo.

Ambos grupos se caracterizan por mantener ciertos cambios comunes en las secuencias aminoacídicas de cada una de las especies que lo integran. Los grupos identificados son los siguientes:

- ✓ Grupo que incluye simios, constituido por monos del nuevo mundo, monos del viejo mundo, grandes monos y humano.
- ✓ Grupo que incluye al resto de los vertebrados, en el caso de este análisis incluye a prosimios (lémur y gálago), cerdo y perro.

Al enfocarse nuevamente en las secuencias de las hormonas analizadas en el presente trabajo, se puede observar la presencia de ciertos residuos aminoacídicos que han sido conservados durante la evolución, a los cuales se les ha atribuido una función primordial en la hormona. Por ejemplo, los residuos aminoacídicos Cys presentes en las posiciones 53 (52 en lémur) y 165 (163 en lémur) forman un puente disulfuro entre la cuarta hélice y el giro (loop) comprendido por los aminoácidos 54 a 74, dando origen a una estructura rígida que corresponde a uno de los dos sitios de interacción de la hormona con su receptor. Por otra parte, se observa la presencia de un segundo puente disulfuro por la interacción de las Cys en las posiciones 182 (180 en lémur) y 189 (188 en lémur), lo que da origen a una mini hélice (figura 27).

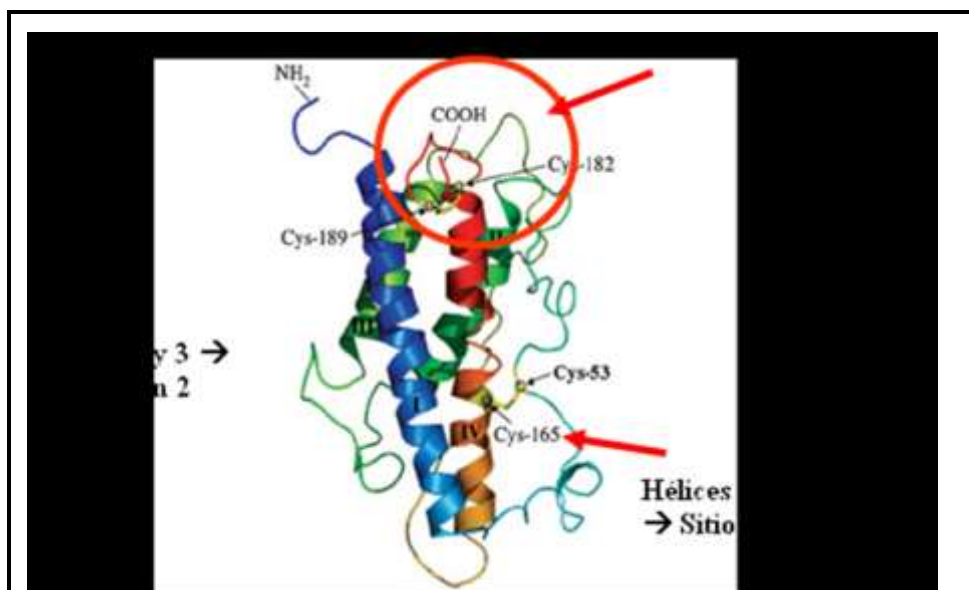


Figura 27: Estructura tridimensional de la hGH. En la figura son destacados los residuos Cys involucrados en mantener la estructura tridimensional de la hGH.

Otro residuo aminoacídico al cual se le ha atribuido una función importante en la hormona corresponde a la Phe⁴⁴. Este aminoácido se encuentra localizado próximo al puente disulfuro Cys⁵³–Cys¹⁶⁵, formando parte de una mini hélice desde la cual ejerce interacciones hidrofóbicas con una serie de residuos aminoacídicos de la porción amino terminal de la hélice 4 (Leu¹⁵⁷, Tyr¹⁶⁰ y Tyr¹⁶⁴) y puede tener una importancia estructural particular en el sitio de unión 1 de la hormona con su receptor. Al respecto, Peterson y Brooks (1997) reportan que este residuo se encuentra presente en todas aquellas hormonas que presentan efecto somatogénico, y que su ausencia en GHs de mamíferos distintos a los primates reduce la afinidad de éstas por el receptor PRL, causando una reducida activación de este último.

En la figura 28 podemos observar que la Phe⁴⁴ está ausente en prosimios, al igual que en vertebrados, por lo cual podríamos esperar que en el caso de la GH-N del lémur, ésta presentara una actividad lactogénica reducida.

A	Y	I	P	K	E	Q	K	Y	S	F	L	Q	N	P	Q	T	S	F	C	F	S	E	S	I	P	T	P	S	G	Majority
										70	Phe ⁴⁴							80											90	
A	Y	I	P	K	E	Q	K	Y	S	F	L	Q	N	P	Q	T	S	L	C	F	S	E	S	I	P	T	P	S	N	Humano
A	Y	I	P	K	E	Q	K	Y	S	F	L	Q	N	P	Q	T	S	L	C	F	S	E	S	I	P	T	P	S	N	Chimpancé
A	Y	I	P	K	E	Q	K	Y	S	F	L	Q	N	P	Q	T	S	F	C	F	S	E	S	I	P	T	P	S	N	Gorila
A	Y	I	P	K	E	Q	K	Y	S	F	L	Q	N	P	Q	T	S	L	C	F	S	E	S	I	P	T	P	S	N	M. Rhesus
A	Y	I	P	K	E	Q	K	Y	S	F	L	Q	N	P	Q	T	S	L	C	F	S	E	S	I	P	T	P	A	S	M. Araña
T	Y	I	P	E	G	Q	R	Y	S	-	I	Q	N	A	Q	A	A	F	C	F	S	E	T	I	P	A	P	T	G	Lemur
A	Y	I	P	E	G	Q	R	Y	S	-	I	Q	N	A	Q	A	A	F	C	F	S	E	T	I	P	A	P	T	G	Mygmaeus
A	Y	I	P	E	G	Q	R	Y	S	-	I	Q	N	A	Q	A	A	F	C	F	S	E	T	I	P	A	P	T	G	Porcine.F
A	Y	I	P	E	G	Q	R	Y	S	-	I	Q	N	A	Q	A	A	F	C	F	S	E	T	I	P	A	P	T	G	Perro.PI

Prosimios y vertebrados

Simios

Simios
Prosimios y
vertebrados

Figura 28: Phe⁴⁴ presente en GHs de simios. Se muestra la posición de la Phe (posición 44 en la hormona madura o posición 71 como es indicado en el alineamiento de la pre-hormona sin procesar y por ende con su péptido señal) en el alineamiento de las secuencias polipeptídicas correspondientes a GHs de diferentes especies, indicada como F de acuerdo al código de una letra para aminoácidos. Este residuo aminoacídico sería importante para la actividad lactogénica de la GH (Peterson y Brooks, 1997).

En una serie de reportes, donde se emplearon técnicas de biología molecular, se han logrado descubrir los residuos aminoacídicos en la hormona madura que participan en la interacción con su receptor, haciendo referencia de paso a aquellos otros residuos que pudieran estar interactuando con el receptor de la prolactina (PRLR), así como señalando cómo éstos han divergido a lo largo de la evolución. En el cuadro 10, nutrido por los datos publicados por Liu y colaboradores (2001) y por los obtenidos en este trabajo, se presenta un panorama más completo de aquellos sitios funcionalmente importantes en estas interacciones, y cómo éstos se han conservado a lo largo del proceso evolutivo.

Cuadro 10: Divergencia de GHs en sitios funcionalmente importantes *.

Sitio*	Puerco*	Bushbsby*	Tarsios*	Lemur	Mono ardilla*	Mono araña	Mono rhesus	Gorila	Chimpancé	Humano
10 ^a	Phe	Phe	Phe	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Phe	Phe
12 ^{43,126}	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn
16 ⁴⁴	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
18 ^{a,b}	Gln	Gln	Gln	Gln	His	His	His	His	His	His
19 ¹⁶⁶	His	His	His	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
21 ^b	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
25 ^{a,b}	Ala	Ala	Ala	Ala	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
29 ^a	Lys	Lys	Lys	Lys	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
41 ^{127,a,c}	Arg	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
45 ^a	gsp	gsp	gsp	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
46 ^{120,c}	Gln	Gln	Arg	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
48 ^a	Ala	Thr	Ser	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
51 ^c	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
54 ^a	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
56 ^a	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
58 ^{a,b}	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile
61 ^{101,a,c}	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
62 ^{b,c}	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser
63 ^b	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Asn
64 ^a	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg
65 ^a	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu
68 ^a	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
164 ^c	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
167 ^{127,b,c}	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
168 ^{104,b,c}	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
171 ^{43,a,c}	His	His	His	His	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
172 ^{a,b}	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
174 ^{a,b}	Glu	Glu	N/A	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
175 ^{43,a,c}	Thr	Thr	N/A	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
176 ^{a,b}	Tyr	Tyr	N/A	Tyr	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
178 ^{161,a-c}	Arg	Arg	N/A	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
179 ^a	Val	Val	N/A	Val	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile
182 ^a	Cys	Cys	N/A	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys
183 ^a	Arg	Arg	N/A	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
185 ^a	Val	Val	N/A	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val

* En superíndices numéricos se destacan los residuos aminoacídicos de la GH que interactúa con residuos aminoacídicos presentes en su receptor, mediante puentes de hidrógeno. En negritas se indican los que cambian en simios en comparación con la secuencia consenso de mamíferos no primates. a.- Residuos importantes para interacción GH-GHR (determinados por mutagénesis sistemática cambiándolos por alanina); b.- Residuos importantes para interacción GH-PRLR (determinados por la misma técnica de mutagénesis); c.- Residuos de GH que se unen al receptor de prolactina del humano. Datos extraídos de Liu y cols., (2001) y complementados con los hallazgos del presente trabajo.

D.- Plásmidos recombinantes.

Los vectores portadores de las unidades transcripcionales (UT) de GHs fueron introducidos por transformación en bacterias calcio competentes, con el fin de propagarlos para obtener una mayor cantidad de material de trabajo. Posteriormente se realizaron mini (o midi) preparaciones de los DNA plasmidicos, cuantificándolos y analizándolos mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar su integridad (figura 29).

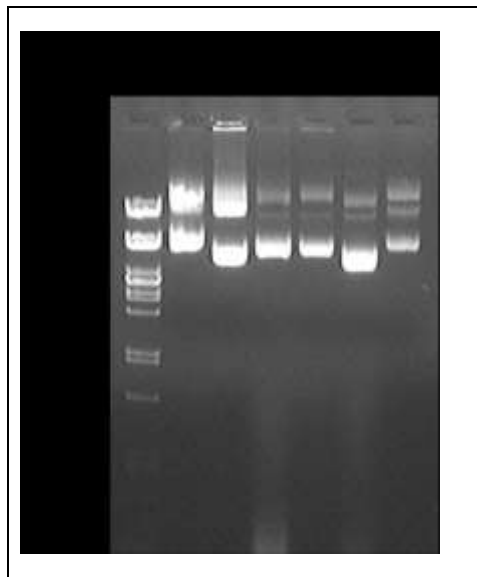


Figura 29: DNA de plásmidos Topo TA y Topo XL portadores de genes GHs. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, en el cual fueron analizados los vectores portadores de las UT de GHs de humano (1), chimpancé (2), gorila (3), mono Rhesus (4), mono araña (5) y lémur(6). Como marcador de peso molecular se empleó al DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima *Pst*I.

Posteriormente, cada uno de los vectores fue analizado mediante corte con la enzima de restricción *Pst*I, que fragmenta las UTs de las GHs en patrones característicos (figura 30). Una segunda caracterización fue realizada mediante corte con la enzima de restricción *Eco*R1, que produce liberación de la UT de cada uno de los plásmidos (figura 31). Los patrones de restricción obtenidos a partir de las digestiones enzimáticas fueron comparados con los obtenidos virtualmente mediante el análisis de digestión realizado in-silico con el programa VectorNTI. Esto permitió confirmar que el material proporcionado correspondía a cada una de las GHs a emplear en el trabajo.

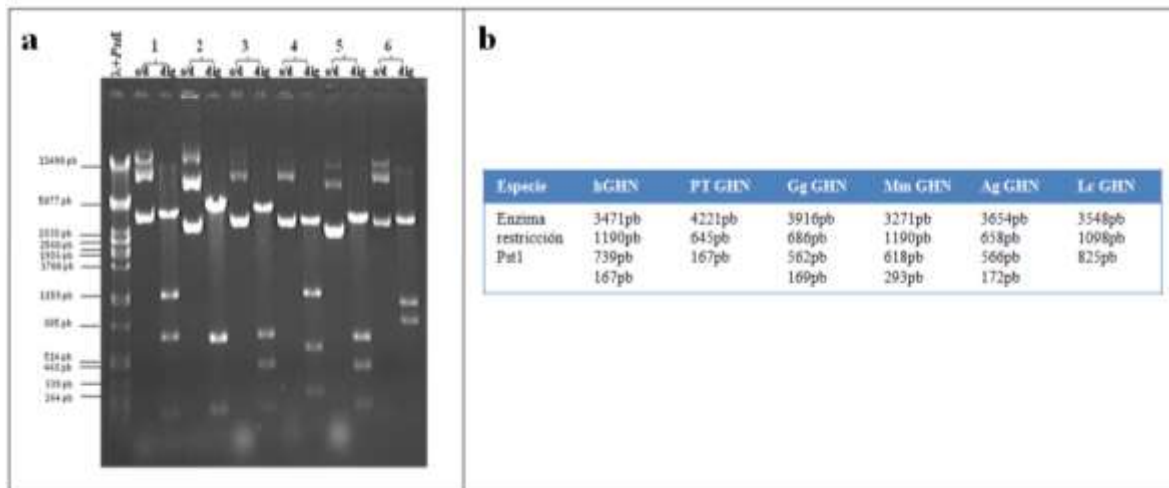


Figura 30 Caracterización de los plásmidos Topo TA y Topo XL portadores de genes GHs con *PstI*. (a)Misma técnica que la descrita en la figura 29 para el análisis de los plásmidos portadores de las UT de los genes para las GHs: plásmido portador de la UT de la GH del humano (1), chimpancé (2), gorila (3), mono rhesus (4), mono araña (5), lémur (6); sin digerir (s/d) o digeridos (dig) con *PstI*. El marcador corresponde al mismo de la figura 29, en esta y las figuras sucesivas. (b) Patrones de restricción característicos esperados para cada plásmido obtenidos a partir de las digestiones virtuales.

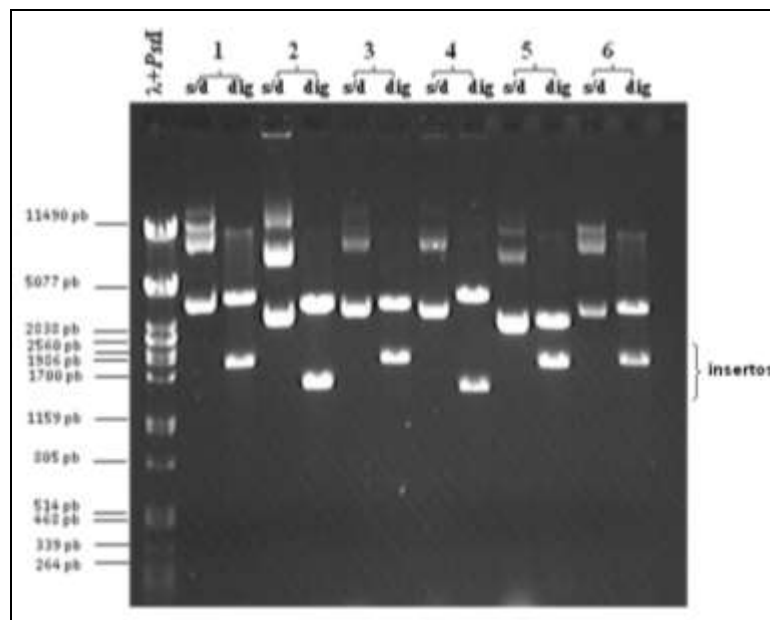


Figura 31 : Caracterización de los plásmidos Topo TA y Topo XL portadores de GHs con *EcoRI*. Igual que en la figura 30, son presentados aquí los resultados de la caracterización Enzimática de los plásmidos en cuestión, pero empleando en este caso la enzima de restricción *EcoRI*. Se observa en cada caso la liberación del inserto correspondiente a la GH-N de cada especie, con patrones de migración electroforética entre 1500 pb a 1900 pb.

6.2.- Subclonación de Unidades Transcripcionales (UTs) de los genes de las GHs.

A.- Obtención de las UTs y su posterior subclonación: casos del humano, lémur y Chimpancé.

El análisis de restricción virtual del vector TopoTA portador de la UT de la hGH reveló que la mejor estrategia de liberación de ésta era mediante cortes con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Eco*RV (figura 32A), mientras que para el caso del plásmido con el inserto de la UT de la GH del lémur, las enzimas de restricción *Bam*HI + *Ale*I permitirían su liberación (Figura 32B).

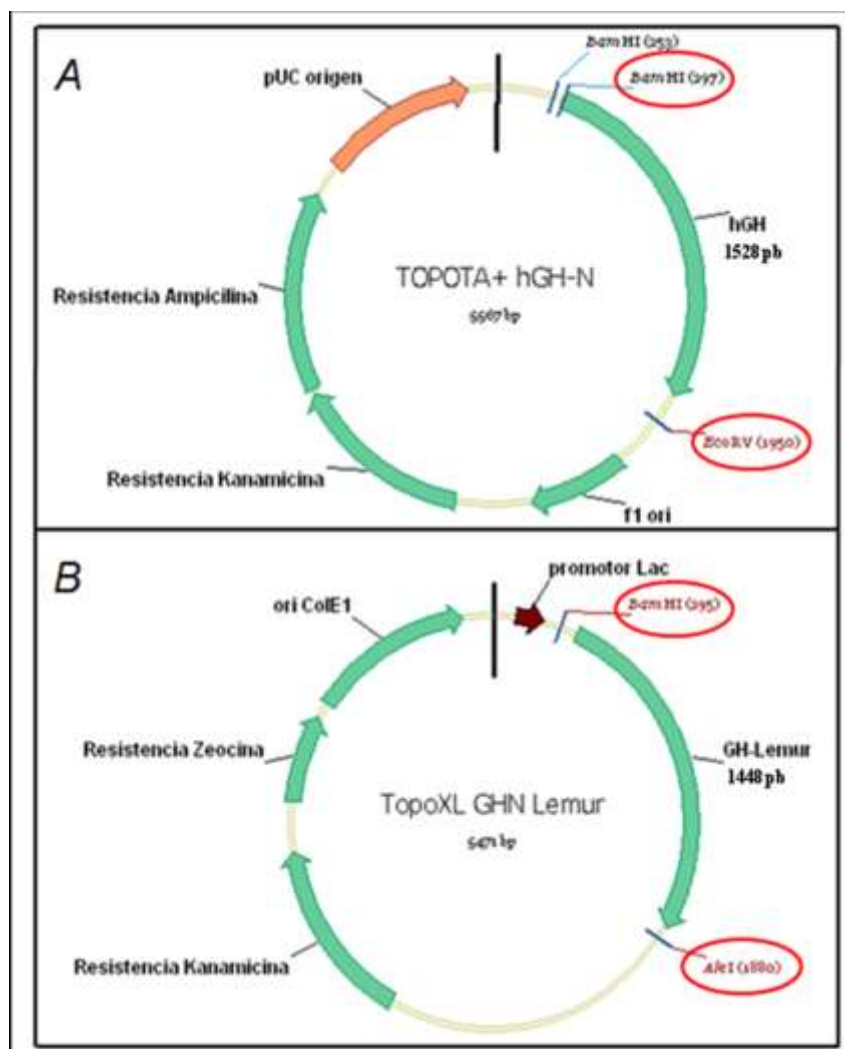


Figura 32: Análisis virtual de los plásmidos TopoTA-hGH y TopoXL-GH-N Lémur.
(A) Representa el análisis virtual de digestión del vector TopoTA-hGH con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Eco*RV, mismas que se usan para liberar la UT completa que porta.
(B) Corresponde al análisis virtual de estricción obtenido para TopoXL-GH-N Lémur con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Ale*I.

En base a la información anterior, los plásmidos portadores de las UT de interés fueron digeridos mediante cortes con las enzimas de restricción seleccionadas, y las UT liberadas fueron primero purificadas, y luego subclonadas en el vector pcDNA3.1H+, previamente linearizado con las enzimas de restricción *Bam*HI + *Eco*RV (figura 33). Es menester aclarar que en el caso de la UT del gen GH del lémur, el corte para liberarla con la enzima de restricción *Ale*I es romo, igual que el de *Eco*RV (figura 33), por lo que dada la compatibilidad de extremos romos, para su subclonación se empleó el mismo vector tratado con *Bam*HI + *Eco*RV.

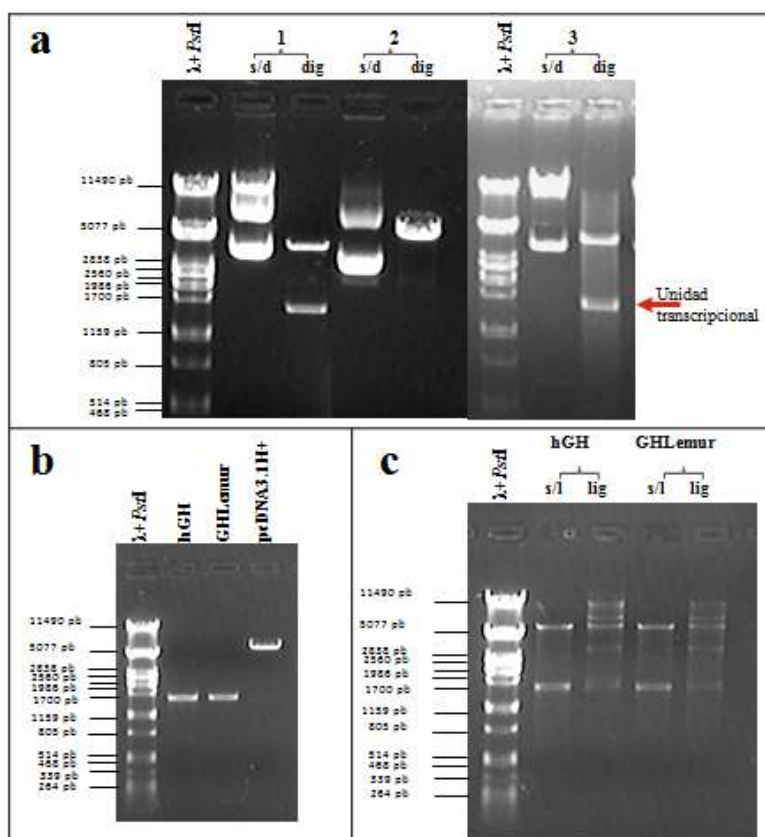


Figura 33: Subclonación de las UT de los genes de las GHs del humano y lémur. (a) Análisis de las UT GHs liberadas con enzimas de restricción. Los números indican: (1) TopoTA-hGH; (2) pcDNA3.1H+ digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RV; (3) TopoXL-GH-N Lémur digerido con *Bam*HI y *Ale*I. (S/d) indica vector sin digerir; (dig) indica digestión enzimática. (b) Electroforesis de los productos de digestión purificados. (c) Electroforesis de la ligación de las unidades transcripcionales en pcDNA3.1H+; (s/l) indica sin ligar y (lig) indica el producto obtenido de la ligación. En los carriles señalados como lig. se puede observar el retardo en el patrón de migración electroforética y la disminución en la cantidad de fragmentos puros producto de la ligación de los vectores. Tanto los geles como el marcador empleado fueron preparados como es descrito en las figuras anteriores.

En cuanto al plásmido TopoXL portador de la UT del gen de la GH-N de chimpancé, el análisis de restricción virtual reveló que la mejor estrategia de subclonación era empleando a las enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRV*, tanto para liberar la unidad transcripcional, como para preparar el vector, ya que ambas están tanto en uno como en el otro (figura 34).

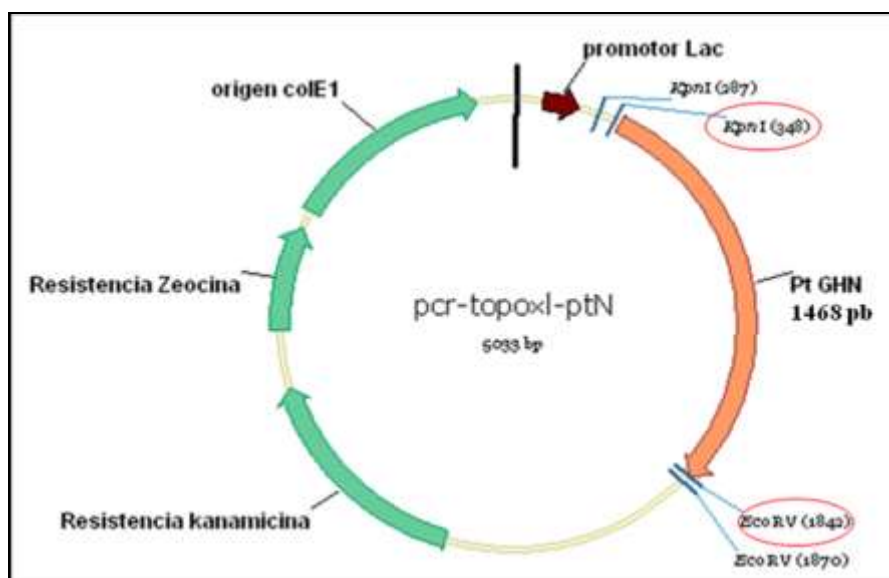


Figura 34: Análisis virtual de vector TopoXL-GH-N Chimpancé. Representa el análisis de digestión virtual del vector portador de la UT de GH-N del chimpancé con las enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRV*.

En la figura 35 son presentados los resultados de la restricción, purificación y subclonación de la UT del gen GH-N del chimpancé.

Una vez terminada la ligación, los materiales resultantes fueron usados para transformar bacterias calcio competentes, mismas que fueron sembradas enseguida en medio LB-agar, seleccionadas por resistencia al antibiótico ampicilina (proporcionada por el vector pcDNA 3.1 H⁺- GHs) y las colonias bacterianas resultantes fueron tamizadas mediante PCR en colonia con iniciadores oligonucleotídicos específicos para la unidad transcripcional GH.

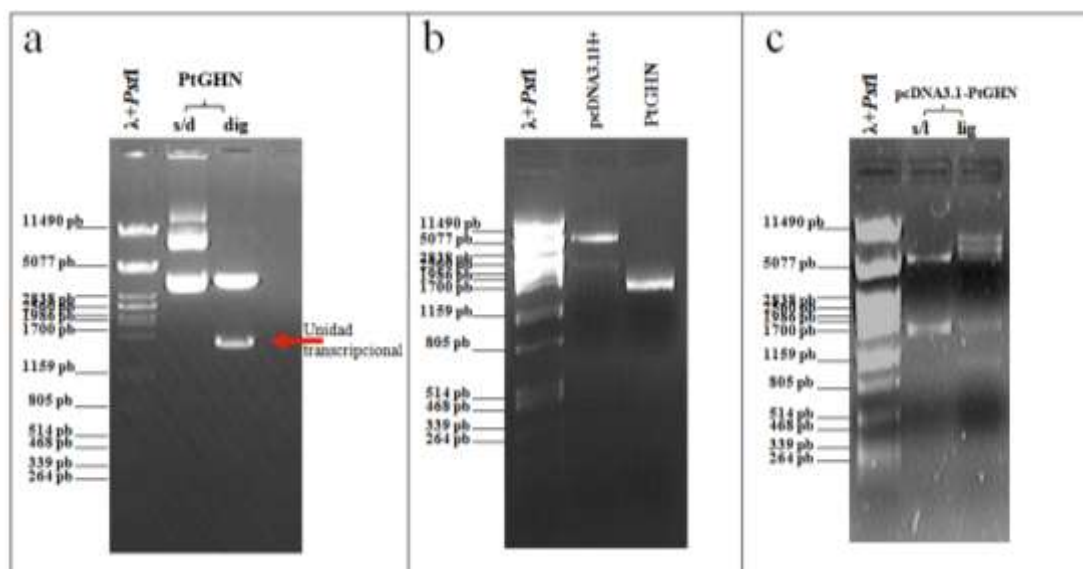


Figura 35: Subclonación de la UT de GH-N del chimpancé. (a) análisis de la restricción de la UT GH-N del chimpancé con las enzimas *KpnI* y *EcoRV*; (S/d) indica vector sin digerir; (dig) indica digestión enzimática. (b) análisis de los productos de digestión enzimática purificados. (c) Electroforesis de la ligación de las UT en pcDNA3.1H+; (s/l) indica sin ligar y (lig) indica el producto obtenido de la ligación. En el carril señalado como lig. se puede observar el retardo en el patrón de migración electroforética y la disminución en la cantidad de fragmentos puros producto de la ligación y construcción del vector recombinante. Tanto los geles como el marcador empleado fueron preparados como fue descrito en las figuras anteriores.

B.- Los casos restantes de las UT de las GHs de interés.

En el caso de las UTs de las GHs del gorila, mono araña y mono rhesus, para su subclonación no se recurrió a la liberación por cortes enzimáticos, sino que se optó por generarlas mediante amplificación por PCR. Esto en virtud de la ausencia de compatibilidades ya sea de uno o del otro sitio de restricción que los flanquean en el vector. Así pues se procedió a utilizar iniciadores que agregan sitios de restricción *Kpn1* y *EcoRV*, al principio y al final de las unidades de transcripción, respectivamente, que son complementarios a los presentes en el sitio de clonación múltiple del vector pcDNA3.1H+. En la figura 36 son presentados los productos de PCR obtenidos para las GHs antes mencionadas, empleando como molde para la reacción de PCR el vector Topo portador de la UT correspondiente.

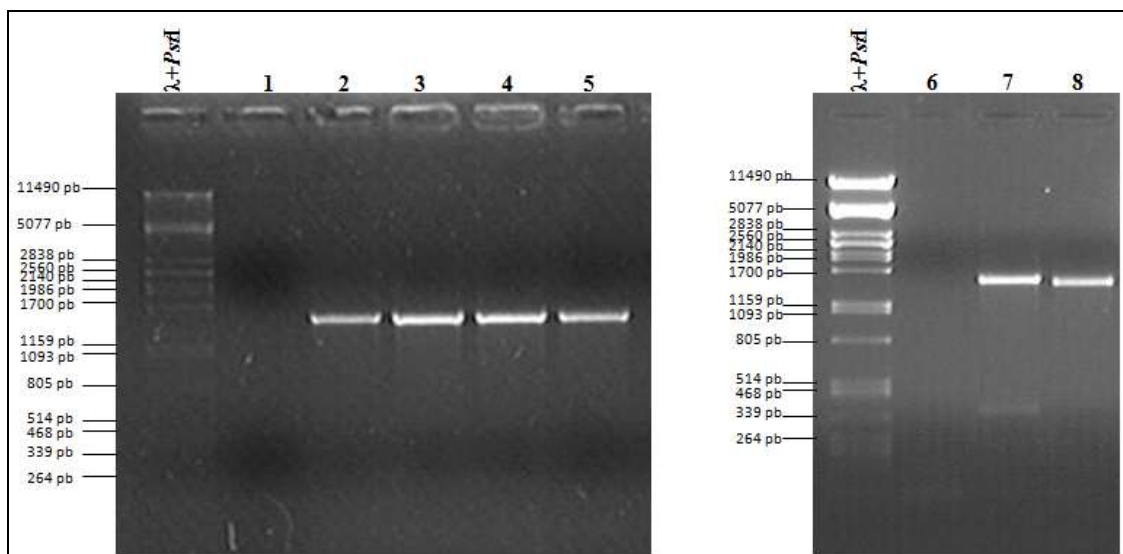


Figura 36: Amplificación de las UTs de GH-N correspondientes a gorila, mono araña y mono rhesus. Análisis de los productos de PCR obtenidos de la amplificación de plásmidos Topo portadores de las UT de GHs. El carril 1 y 6 corresponden al blanco de la reacción de PCR; carriles 2 y 3 a productos de PCR del gen de GH-N del gorila; carriles 4 y 5 a productos de PCR del GH-N de mono araña; carriles 7 y 8 a productos de PCR del gen GH-N del mono rhesus. Tanto los geles como el marcador empleado fueron preparados como es descrito en las figuras anteriores.

Una vez amplificados, los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción antes indicadas, purificados y subclonados por ligación para obtener los vectores de expresión recombinantes (figura 37).

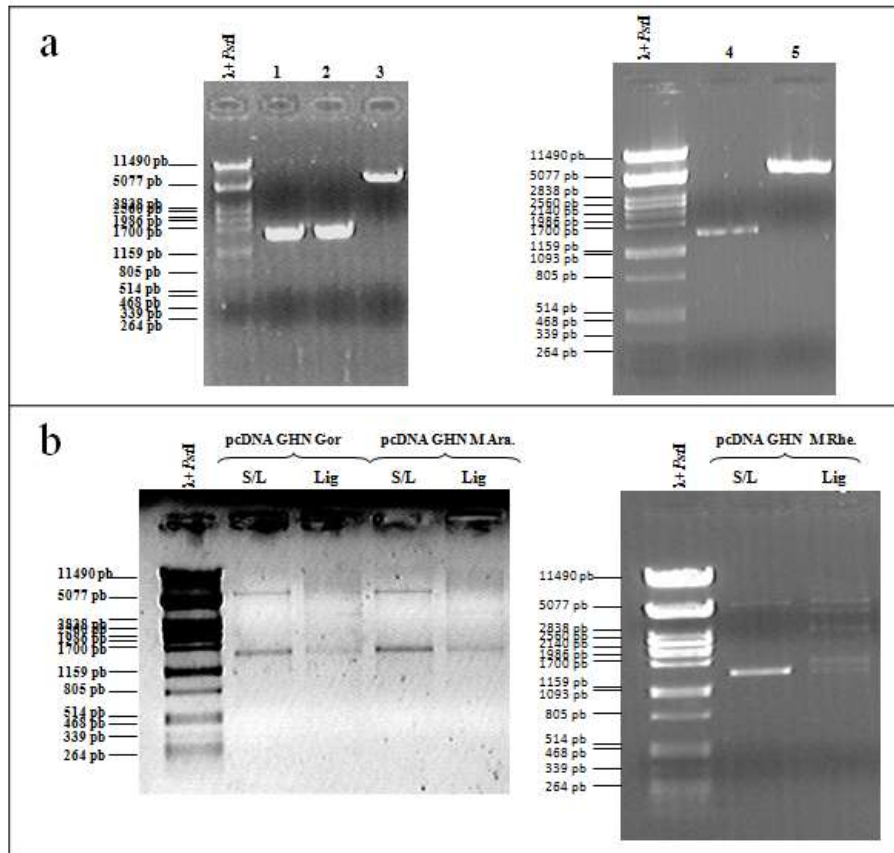


Figura 37: Subclonación de las UTs de las GHs del gorila, mono araña y mono rhesus.

(a) Electroforesis de los productos puros de las UTs de las GH-Ns en cuestión y vector pcDNA3.1H+ obtenidos mediante digestiones con las enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRV*: carril 1 gorila; carril 2 mono araña; carril 4 mono Rhesus; carriles 3 y 5 vector pcDNA3.1H+. (b) Electroforesis de ligación de las UT de GHs en pcDNA3.1H+; (s/l) indica sin ligar y (lig) indica el producto obtenido de la ligación. En los carriles señalados como lig. se puede observar el retardo en el patrón de migración electroforética y la disminución en la cantidad de fragmentos puros producto de la ligación y construcción de los vectores recombinantes. Tanto los geles como el marcador empleado fueron preparados como es descrito en las figuras anteriores.

Una vez terminada la ligación, los nuevos vectores generados fueron empleados para transformar bacterias calcio competentes. Estas fueron sembradas en medio LB-agar y las que captaron al vector fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico ampicilina, proporcionada por el vector pcDNA 3.1 H+- GHs, presente en las cajas de petri con LB-agar + el antibiótico. De éstas, las portadoras de vectores recombinantes (es decir portadoras de las unidades de transcripción de interés) fueron distinguidas mediante PCR en colonia con los iniciadores específicos para amplificar la unidad transcripcional de la

GH en cuestión. Finalmente, cada uno de los vectores recombinantes generados fueron caracterizados mediante cortes con enzimas de restricción.

6.3.- Caracterización de vectores recombinantes.

De la subclonación de las UTs resultaron seis nuevos vectores de expresión recombinantes tipo pcDNA3.1- GH-N, cada uno portador de la correspondiente UT de GH estudiada en el presente trabajo. Además, y como referencias, fueron construidos los vectores pcDNA3.1- hGH 20kDa y pcDNA3.1-hGH 22kDa, portadores de los DNAs que originan las isoformas proteicas de 20kDa y 22kDa de la hGH-N (figura 38).

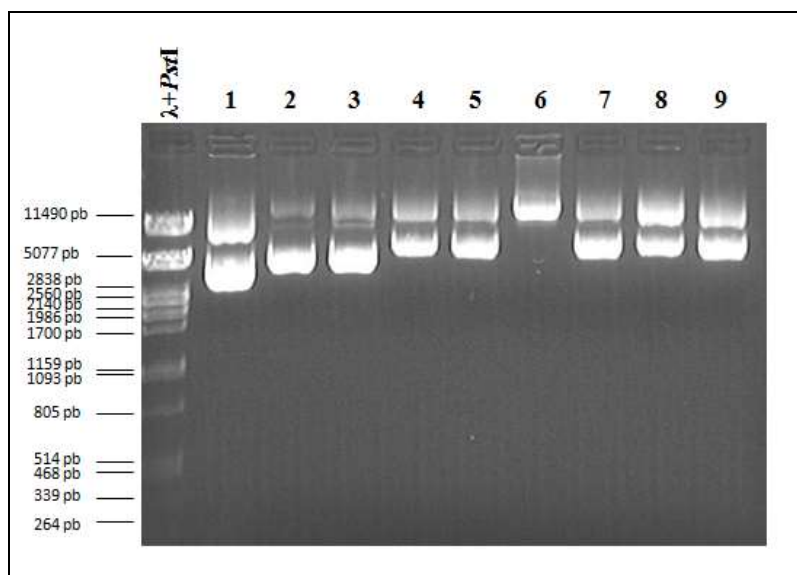


Figura 38: DNA plasmídico de vectores recombinantes pcDNA3.1H+ portadores de GHs. Análisis de los vectores portadores de los DNAs de GHs del humano de 20kDa (2), humano de 22kDa (3), de las UT de la GH del humano (4), chimpancé (5), gorila (6), mono rhesus (7), mono araña (8) y lémur (9). En el carril 1 se muestra el patrón de migración electroforética de pcDNA3.1H+. En cada uno de los carriles se puede apreciar la integridad del DNA plasmidial obtenido. Tanto el gel como el marcador empleado fueron preparados como fue descrito en las figuras anteriores.

Los vectores recombinantes fueron caracterizados mediante cortes con enzimas de restricción para confirmar su identidad. Para ello se generaron las secuencias completas de cada uno de ellos mediante el programa computacional VectorNTI (datos presentados en anexo) y sometidos a restricciones virtuales. Los resultados del análisis bioinformático fueron comparados con los obtenidos en el laboratorio al ser sometido cada uno de los

vectores recombinantes con las enzimas *Pst*I, que permite diferenciar cada una de las UT analizadas, y con *Kpn*I + *Eco*RV que producen la liberación del inserto de la UT de GH previamente clonada en el vector (figura 39).

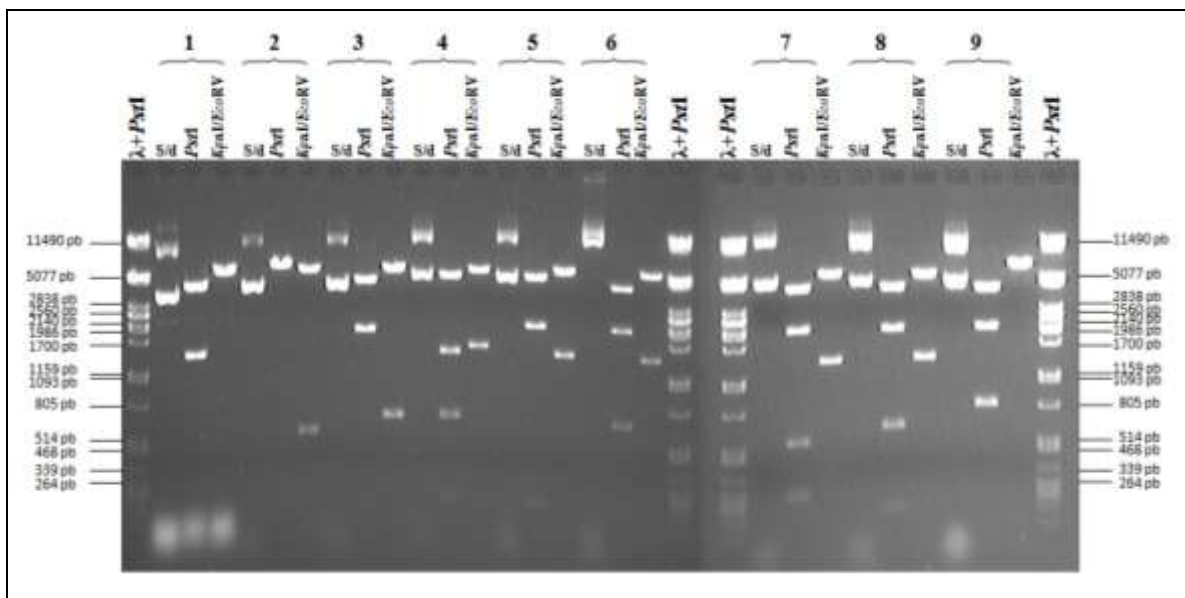


Figura 39: Caracterización de vectores recombinantes pcDNA3.1H+ portadores de las UT de las GHs, con las enzimas de restricción *Pst*I y *Kpn*I + *Eco*RV. Análisis de los productos de restricción obtenidos de los vectores portadores de las UT de GHs. Los números superiores indican la muestra analizada por restricción: pcDNA3.1H+ (1), pcDNA3.1H+ DNAc hGH 20kDa (2), pcDNA3.1H+ DNAc hGH 22 kDa (3), vectores portadores de las UT del humano (4), chimpancé (5), gorila (6), mono rhesus (7), mono araña (8), y lémur(9); (s/d) vector sin digerir. Tanto el gel como el marcador empleado fueron preparados como es descrito en las figuras anteriores.

6.4.- Ensayos de transfección

A.- Estandarización de las transfección.

Empleando el vector pcDNA3.1-hGH se realizó la estandarización inicial del protocolo de transfección, con el objetivo de determinar el tiempo óptimo para recuperar proteínas y obtener RNA de buena calidad. Para ello fueron sembradas células HeLa en placas multiplato de 24 pozos y transfectadas con una concentración 0.5 µg del vector de expresión portador de la unidad transcripcional de la hGH. La recolección de medio de cultivo fue realizada por triplicado hasta las 96 horas post tratamiento, con intervalos de 12

horas.

A cada uno de los sobrenadantes obtenidos se les efectuó la detección de GH mediante Radio Inmuno Ensayo (RIA, por sus siglas de inglés) obteniéndose los resultados presentados a continuación (figura 40):

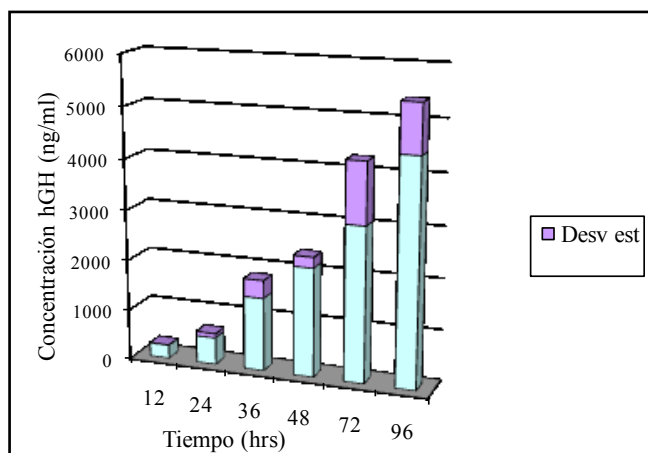


Figura 40: Producción de hGH en células HeLa transfectadas con el vector de expresión de la hGH-N. En la gráfica las barras representan la cantidad de hGH detectada mediante RIA en ng/ml, en los ensayos realizados por triplicado. La recolección de muestra fue realizada cada 12 horas hasta cumplidas 96 horas post transfección. Los recuadros superiores de cada barra de producción representan la desviación estándar obtenida en cada triplicado.

En la gráfica podemos observar como aumenta la producción de GH a través del tiempo. Sin embargo, comparando este resultado con la observación microscópica del cultivo celular, se pudo observar que pasadas las 72 horas, la monocapa celular comenzaba a desprenderse y que el medio de cultivo se acidificaba, condiciones que dificultaban el empleo de los sobrenadantes en un posterior ensayo de diferenciación por la presencia de células muertas y metabolitos tóxicos, además de obtener pobre rendimiento en la extracción del RNA celular.

B.- Transfección de GH-N recombinantes.

Una vez determinada las condiciones óptimas de transfección que permitieran una adecuada obtención de hormonas recombinantes y buena calidad de RNA, cada uno de los vectores de expresión construidos fueron transfectados en la línea celular HeLa.

B.1.- Determinación de GH mediante RIA a partir de sobrenadantes.

En una etapa inicial, los medios obtenidos por triplicado 72 horas postransfección con los vectores portadores de las UTs de las GH-N en estudio contruidos hasta entonces, fueron sometidos a determinación de GH en suero mediante RIA para la GH-N humana, obteniéndose los siguientes resultados (figura 41):

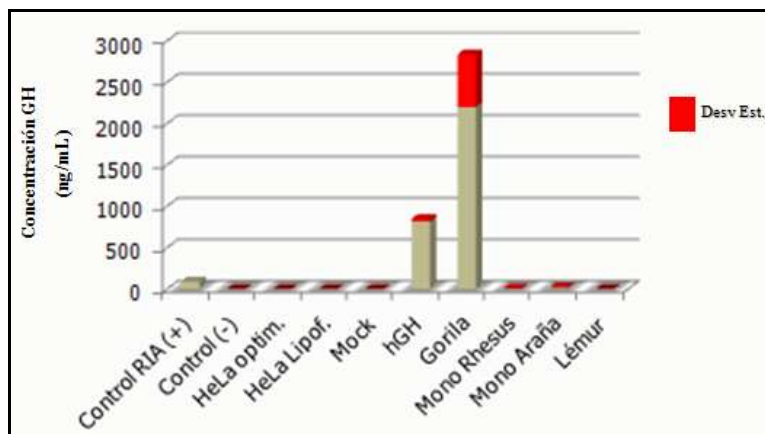


Figura 41: Producción de GHs en células HeLa transfectadas con vectores de expresión de las GHs de interés. En la grafica las barras representan la cantidad de GH detectada mediante RIA en ng/ml, en los ensayos realizados por triplicado. La recolección de muestra fue realizada 72 horas post transfección. Como control positivo de la detección se utilizó medio Opti-MEM™ bajo en suero suplementado con 40ng/ml de hGH comercial, mientras que el control negativo de la detección por RIA corresponde a Opti-MEM™ bajo en suero.

Se observó que la detección de GH mediante RIA sólo permite cuantificar a las hormonas en los medios de cultivo recuperados de células HeLa transfectadas con sendos vectores de expresión portadores de las UT de las GH humana y del gorila, además del control positivo de HGH comercial (40 ng/ml), que se observa en la primera barra de la gráfica en la figura 41. Hasta este punto de las investigaciones, en el cual fueron efectuadas estas detecciones, el vector portador de la unidad transcripcional de la GH del chimpancé no había sido construido, sin embargo, dada la similitud existente entre esta hormona y las producidas por humano y gorila, es probable que esta hubiera sido detectada en el experimento. En el caso de mono rhesus, mono araña y lémur, la detección arroja niveles de hormona comparables a los presentes en el control negativo del ensayo y a los detectados en el medio recuperado de los cultivos celulares mantenidos sólo en medio Opti-MEM™

bajo en suero, células tratadas sólo con lipofectamina, y células tratadas con el vector de expresión sin UT de GH (mock), es decir, a los restantes testigos negativos del experimento.

C.- Determinación de isoformas de GH mediante Western blot.

Las proteínas totales presentes en el medio de cultivo correspondiente a cada ensayo de transfección, fueron resueltas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los resultados obtenidos a partir de la detección mediante Western blot de hormonas recombinantes producidas en este trabajo, en el modelo celular HeLa, son presentados en la figura 42.

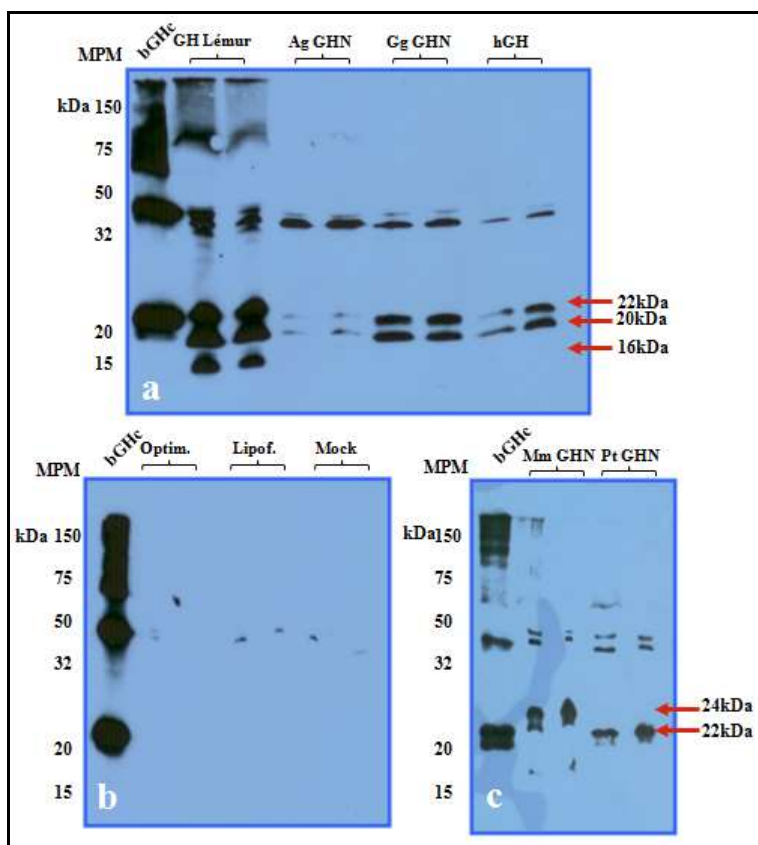


Figura 42: Western blot de muestras del medio de células HeLa transfectadas. Se presentan los resultados de la detección por quimioluminiscencia de hormonas de crecimiento recombinantes con anticuerpos anti-bGH marcados. MPM corresponde al marcador de peso molecular; bGHc es GH bovina comercial; (a) GH Lem. muestra proveniente de células transfectadas con pcDNA3.1 H⁺-GH-N lémur; Ag. muestra proveniente de células transfectadas con pcDNA3.1 H⁺-GH-N mono araña; Gg. muestra proveniente de células transfectadas con pcDNA3.1 H⁺-GH-N gorila; hGH muestra proveniente de células transfectadas con pcDNA3.1 H⁺-hGH. (b) optim. muestra de células tratadas con Opti-MEMTM; Lipof. muestra proveniente de células tratadas con Lipofectamina; Mock corresponde a la muestra proveniente de células transfectadas con el vector sin inserto de GH. (c) Mm. muestra proveniente de células transfectadas con pcDNA3.1 H⁺-GH-N mono Rhesus; Pt. muestra proveniente de células transfectadas con pcDNA3.1 H⁺-GH-N chimpancé.

Tanto en (a) como en (b) son indicados por flechas la detección de GH, además de observarse patrones de migración electroforética de aproximadamente 40 kDa que pueden corresponder a multímeros de hormona.

Como se puede observar en la figura 42, en todos los sobrenadantes recuperados a partir de células sometidas a transfección con vectores de expresión recombinantes fue posible detectar la presencia de GH (figuras 42 a y c). Además se pudo apreciar la presencia de al menos dos isoformas proteicas en la mayoría de los ensayos, que presentaban patrones de migración electroforética correspondientes a las isoformas de 20 kDa y 22 kDa que ya han sido descritas para la hGH, amén de la presencia de dímeros de proteínas que presentan un patrón de migración electroforética superior a 40 kDa. Por otro lado, en el sobrenadante recuperado de la transfección con el vector de expresión portador de la UT de lémur, fue detectada una banda con patrón de migración electroforética menor, correspondiente a aproximadamente 16 kDa, así como bandas intensas que presentan patrones de migración electroforética de 22 y 24 kDa. Además, sobre la banda correspondiente a 24 kDa se observa también un pequeño “pico” con migración electroforética un tanto mayor que puede corresponder a una banda en la región comprendida entre 24 y 25 kDa. Para mono rhesus se observaron dos patrones de migración electroforética correspondientes a proteínas de 22 kDa y 24 kDa similares a los detectados en lémur. Tanto en mono Rhesus como en lémur, la presencia de bandas con patrones de migración electroforética superior, pueden ser originados por modificaciones postraduccionales del tipo de glicosilaciones.

C.1.- Ensayo de desglicosilación.

Los sobrenadantes obtenidos a partir de las células transfectadas con los vectores pcDNA3.1H+-GH-N-mono rhesus y pcDNA3.1H+-GH-N-lémur fueron sometidos al ensayo de desglicosilación, con el fin de determinar si la presencia de los polipéptidos con un patrón de migración ligeramente superior al presentado por la isoforma esperada era ocasionado por glicosilación de ésta. En la figura 43 se presentan los resultados del Western blot de las GHs sometidas a este tratamiento.

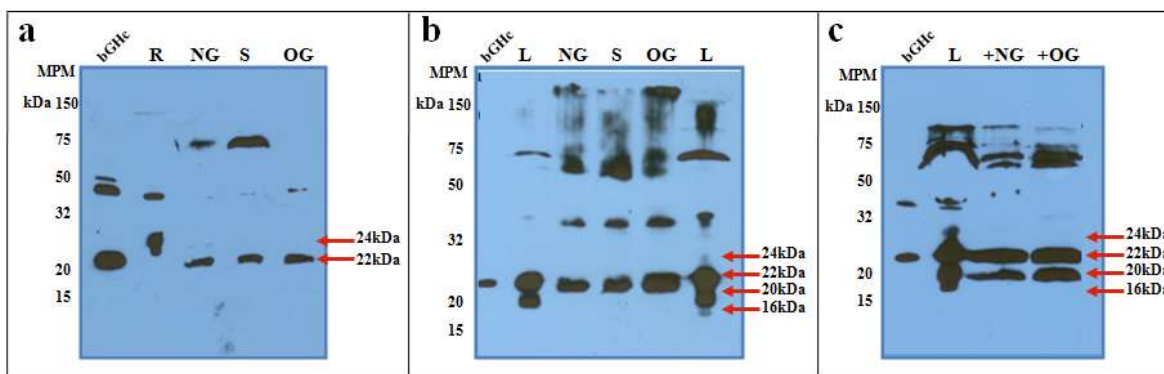


Figura 43: Western blot de muestras sometidas al ensayo de desglicosilación. Detección por quimioluminiscencia, con anticuerpos anti-bGH marcados, de hormonas de crecimiento recombinantes sometidas a desglicosilación,. MPM corresponde al marcador de peso molecular; bGHc corresponde a GH bovina comercial; (a) GH-N- Rhesus [R] sometida a tratamiento de desglicosilación independiente con: [NG] N-Glicanasa; [S] Sialidasa A; [OG] O-Glicanasa. (b) GH-N- lemur [L] sometida a tratamiento de desglicosilación independiente con: [NG] N-Glicanasa; [S] Sialidasa A; [OG] O-Glicanasa. (c) GH-N- lemur [L] sometida a tratamiento de desglicosilación acumulativo con: [+NG] N-Glicanasa; [+S] N-Glicanasa más Sialidasa A. En cada caso se observa, luego del tratamiento de desglicosilación, la desaparición de las bandas con migración electroforética superior (24-25 kDa), detectándose sólo aquellas isoformas con migraciones electroforéticas de 20 y 22 kDa.

Como se puede observar en la figura 43, recuadro a, luego de tratar la GH-N de mono rhesus con tamaños mayores al esperado, con cada una de las glicosilasas, ésta adquiere el patrón de migración electroforética correspondiente a una proteína de 22 kDa, igual al observado para la isoforma activa principal de GH. Lo mismo ocurrió para el lemur, luego del tratamiento tanto por separado (figura 43b), como combinando con ambas enzimas desglicosilasas (figura 43c). En resumen se observó un incremento de la abundancia de la proteína con patrón de migración electroforética correspondiente a 22 kDa, desaparición de la banda observada en la región comprendida entre 25-22 kDa, e incluso del producto con migración correspondiente a 16 kDa.

D.-Determinación de variantes de RNAm.

D.1.- RT-PCR

El RNA total obtenido de cada ensayo de transfección fue resuelto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% - isotiocianato de guanidina, para evaluar la calidad de las muestras, cuantificado espectrofotométricamente y empleado en ensayos de RT-

PCR. Como se observa en la figura 44, los RNAs extraídos presentaron una buena calidad y se observan con claridad las bandas con patrones de migración electroforética de las subunidades ribosomales 28s y 18s.

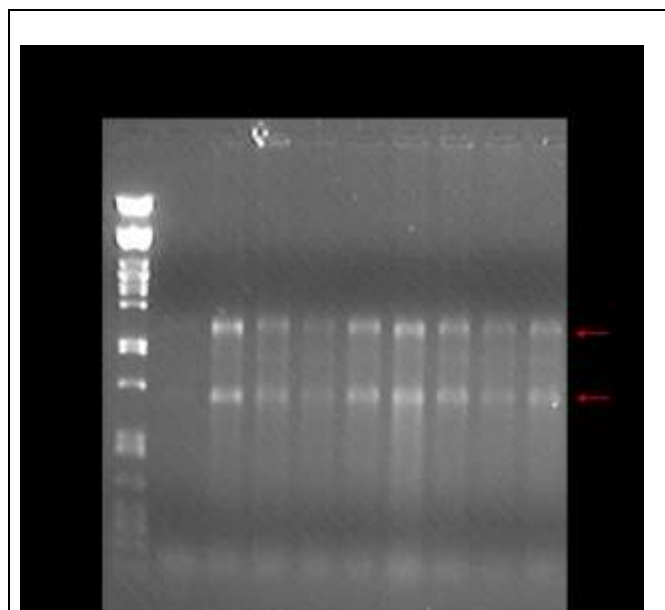


Figura 44: Electroforesis de RNA obtenido de células HeLa transfectadas. Electroforesis en gel al 1% agarosa- isotiocianato de guanidina de los RNAs extraídos de células HeLa sometidas al protocolo de transfección. Las fechas indican los patrones de migración electroforética de las subunidades de RNA ribosomales 28s y 18s. Como marcador de peso molecular se empleó al DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima *Pst*I.

Después de llevar a cabo la síntesis del DNAc de cada una de las muestras, se realizó la reacción de PCR. Los productos obtenidos fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa. Como se puede observar en la figura 45, para la mayoría de las GHs se aprecia una banda intensa, con migración electroforética de aproximadamente 760 pb, correspondiente al tamaño esperado para el amplicón a partir del RNAm que da origen a la hormona de 22 kDa. En el caso del lémur se observa que la banda más intensa es aquella que presenta un patrón de migración electroforética de aproximadamente 715 pb, que correlaciona con el correspondiente al de la segunda isoforma de RNAm descrita para el humano, que da origen a la isoforma de 20 kDa. Por otra parte, también se observan en cada una de las muestras bandas menos intensas con patrones de migración electroforética menor, que pueden ser correlacionadas con

productos originados por empalme alternativo de cada uno de los transcritos primarios, precursores de los respectivos RNAm. En el caso de mono araña, se pueden observar dos bandas con intensidad media, que presentan migración electroforética mayor a la descrita para el RNAm principal. Estas pueden ser originadas por empalmes alternativos originados por retención de intrones.

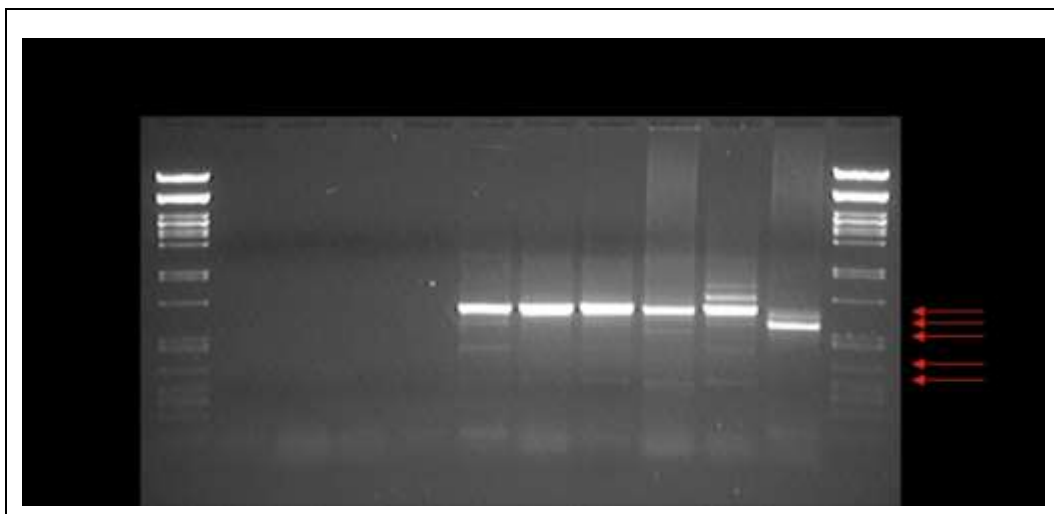


Figura 45: Amplificación por PCR de los DNAc de los RNAm de GHs analizadas en este trabajo. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada sobre los DNAc de cada una de las GHs analizadas. El marcador de peso molecular es el mismo que en la figura anterior.

D.2.- Hibridación tipo Northern.

A.- Obtención de sonda

A partir del DNAc correspondiente al RNAm de la GH-N del gorila, fue realizada la amplificación por PCR de la sonda a emplear en el ensayo de hibridación tipo Northern. Las condiciones descritas en material y métodos permitieron obtener el producto de 285 pb, que fue resuelto mediante electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la figura 46a. Posteriormente, el producto de PCR fue purificado desde el gel y concentrado para su empleo como sonda en la hibridación (figura 46b).

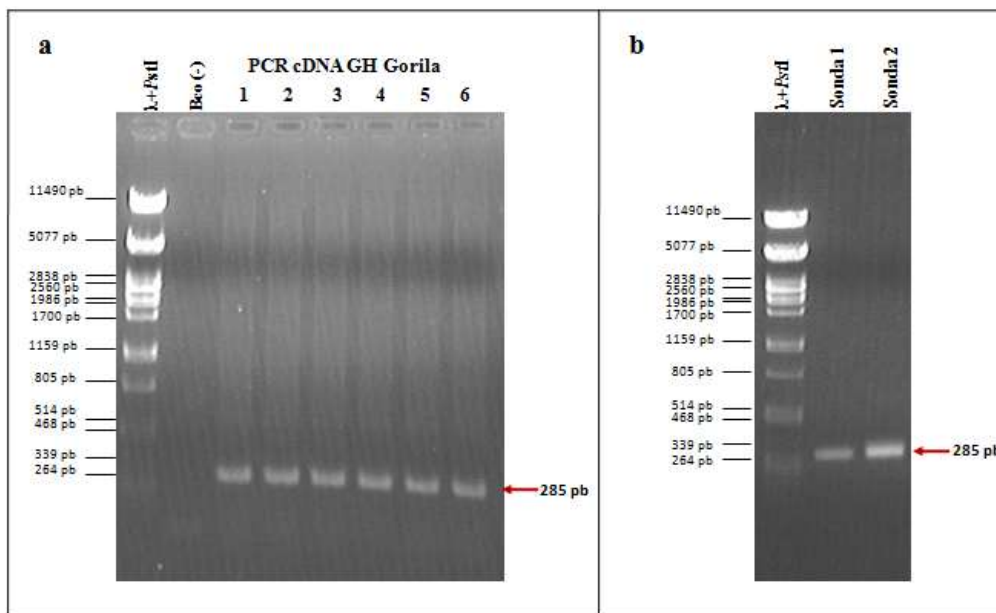


Figura 46: Amplificación por PCR de la sonda para la hibridación tipo Northern. (a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada sobre el DNAC del gorila con los iniciadores IGP IV y D10. (b) Electroforesis de sondas concentradas y purificadas. Como marcador de peso molecular se empleó el mismo que en las figuras anteriores.

B.- Detección de RNAm mediante hibridación tipo Northern.

Para realizar la detección de los RNAm de GHs, 20 µg de RNA total de células HeLa fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído (figura 47), observándose patrones de migración electroforética satisfactorios y una excelente calidad de RNA. Posteriormente, el RNA fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con la sonda previamente marcada, para finalmente detectar por quimioluminiscencia los RNAm de cada uno de los genes analizados (figura 48). Se puede observar la presencia de una sola especie de RNAm, salvo en aquellas muestras que correspondían a controles negativos del experimento, con el patrón de migración electroforética correspondiente al número de bases esperados para la especie molecular principal de los RNAm de las GHs en estudio.

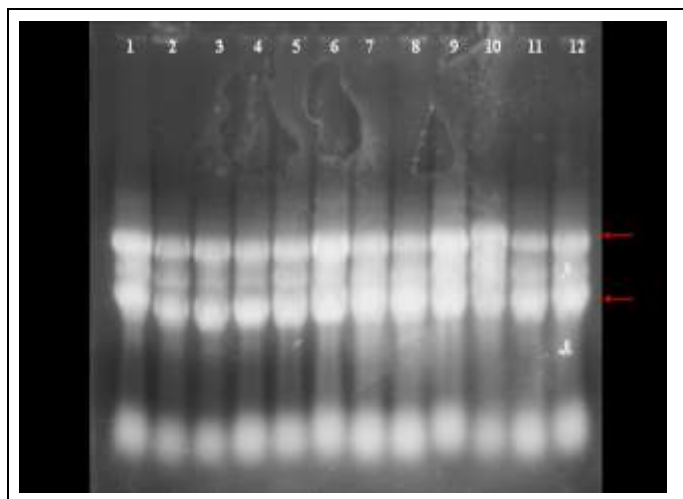


Figura 47: Electroforesis de RNA para detección de mensajeros por hibridación tipo Northern. Se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1%- formaldehído al 5%, realizada para 20 µg RNAs obtenidos de células HeLa transfectadas, previo a la detección por hibridación tipo Northern. Carril (1) sonda preparada de GH de gorila (empleado como control positivo de detección) + RNA de células transfectadas con hGH 20 kDa; (2) RNA de células transfectadas con hGH 22 kDa; (3) RNA de células mantenidas en Opti-MEM™; (4) RNA de células mantenidas en Opti-MEM™ + lipofectamina; (5) RNA de células transfectadas con vector pcDNA3.1H+ (MOCK); (6) RNA de células transfectadas con hGH extraído luego de 17 horas iniciada la transfección; (7) RNA de células transfectadas con hGH; (8) RNA de células transfectadas con GH-N-chimpancé; (9) RNA de células transfectadas con GH-N-gorila; (10) RNA de células transfectadas con GH-N-mono rhesus; (11) RNA de células transfectadas con GH-N-mono araña; (12) RNA de células transfectadas con GH-N-lémur. Las flechas indican los patrones de migración electroforética de las subunidades de RNA ribosomales 28s y 18s. En cada carril se puede apreciar la excelente calidad y la cantidad equivalente de cada una de las muestras a emplear en el posterior ensayo de detección de RNAm de GHs.



Figura 48: Autorradiografía de hibridación tipo Northern. Se muestra el resultado de la detección con la sonda marcada por quimioluminiscencia. Carriles: (1) sonda preparada de GH de gorila (empleado como control positivo de detección) + RNA de células transfectadas con hGH 20 kDa; (2) RNA de células transfectadas con hGH 22 kDa; (3) RNA de células mantenidas en Opti-MEM™; (4) RNA de células mantenidas en Opti-MEM™ + lipofectamina; (5) RNA de células transfectadas con vector pcDNA3.1H+ (MOCK); (6) RNA de células transfectadas con hGH, extraído luego de 17 horas iniciada la transfección; (7) RNA de células transfectadas con hGH; (8) RNA de células transfectadas con GH-N-chimpancé; (9) RNA de células transfectadas con GH-N-gorila; (10) RNA de células transfectadas con GH-N-mono rhesus; (11) RNA de células transfectadas con GH-N-mono araña; (12) RNA de células transfectadas con GH-N-lémur. En la figura se observa la detección de las muestras controles y la correspondiente a la especie principal de los RNAm de GHs pertenecientes a las especies en estudio.

6.5.- Ensayos de actividad biológica

A.- Conversión adiposa.

El potencial de actividad adipogénico de las GHs en estudio fue determinado por los cambios morfológicos experimentados por células preadipocíticas de la línea 3T3L1 en cultivo, tratadas con medios suplementados con las hormonas recombinantes obtenidas del protocolo de transfección. Como se observa en la figura 49, las células tratadas con medio de cultivo suplementado con aproximadamente 20 ng/mL de GHs obtenidas de las transfecciones (figura 49 de E a I), fueron capaces de inducir diferenciación adiposa, al igual que las células tratadas con medio de cultivo suplementado con hGHc a una concentración de 40 ng/mL (control positivo de diferenciación adiposa figura 49D). En todas ellas se puede observar el cambio de morfología de fibroblasto a adiposito, con acumulación de lípidos en su interior.

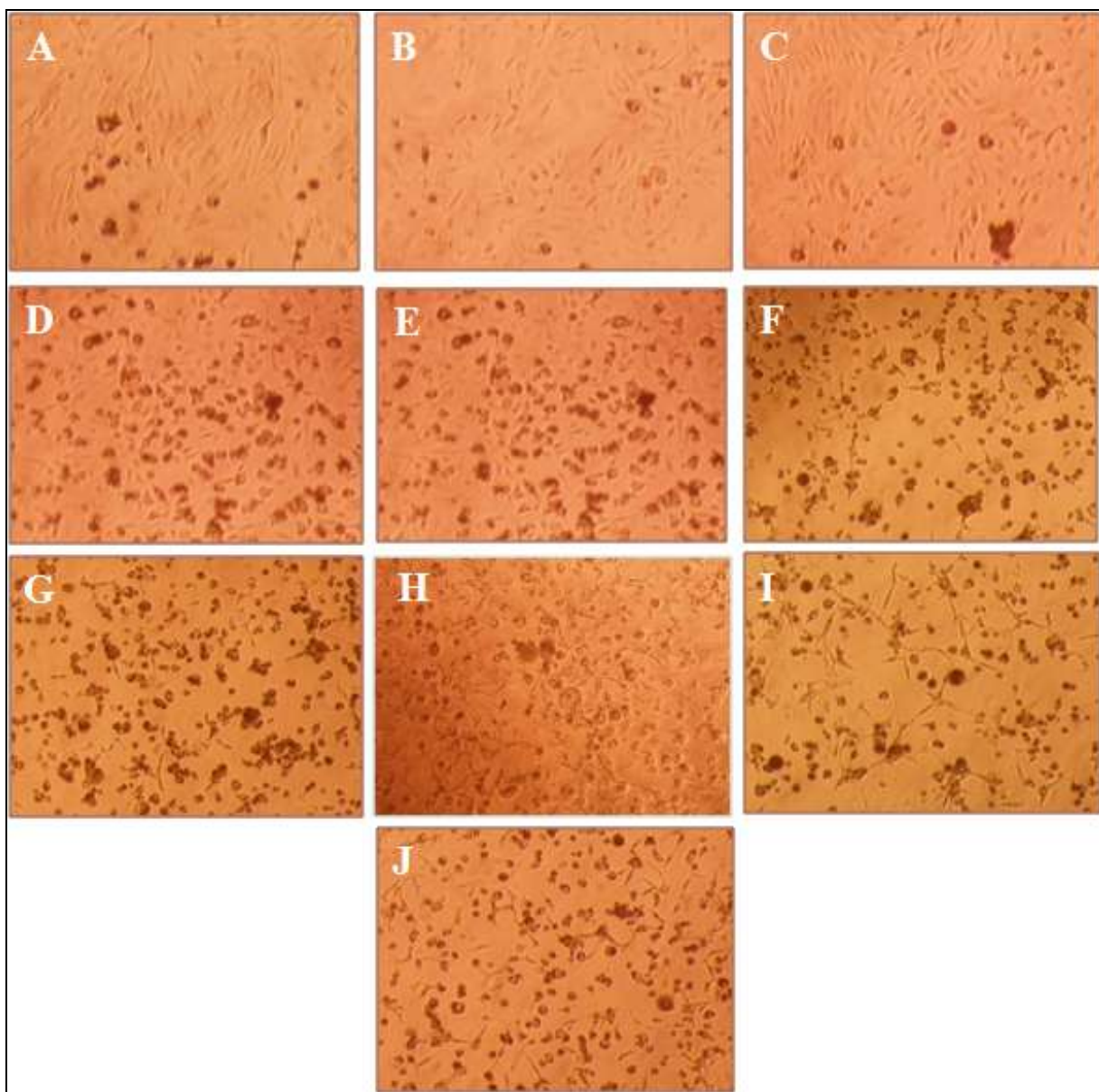


Figura 49: Inducción de diferenciación adiposa en células 3T3L1 tratadas con GHs obtenidas de transfección. Imágenes de microscopía obtenidas de cultivos de células 3T3L1 tratadas con los diferentes medios de cultivo conteniendo GHs recombinantes del protocolo de transfección. (A) Células mantenidas en medio definitivo (control negativo); (B) Células tratadas con medio suplementado con sobrenadantes de transfección con pcDNA3.1H+ (MOCK); (C) Células tratadas con medio suplementado con sobrenadantes de tratamiento con lipofectamina; (D) Células tratadas con medio suplementado con hGHc 40ng/mL (control positivo); (E) Células tratadas con medio suplementado con hGH de transfección a una concentración de 20ng/mL; (F) Células tratadas con medio suplementado con 20ng/mL GH-N-gorila; (G) Células tratadas con medio suplementado con 20ng/mL GH-N-chimpancé; (H) Células tratadas con medio suplementado con 20ng/mL GH-N-mono Rhesus; (I) Células tratadas con medio suplementado con 20ng/mL GH-N-mono araña; (j) Células tratadas con medio suplementado con 20ng/mL GH-N-lémur.

B.- RT-PCR semicuantitativa de marcadores moleculares de diferenciación adiposa.

B.1.- Extracción de RNA total de células 3T3L1.

El RNA total obtenido de células 3T3L1 sometidas por triplicado al protocolo de diferenciación adiposa fue resuelto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con isotiocianato de guanidina, para evaluar la calidad de las muestras, cuantificarlo espectrofotométricamente y emplearlo en ensayos de RT-PCR. Tanto los patrones de migración electroforética (figura 50), los datos espectrofotométricos y el rendimiento de la extracción resultaron satisfactorios al término del ensayo.

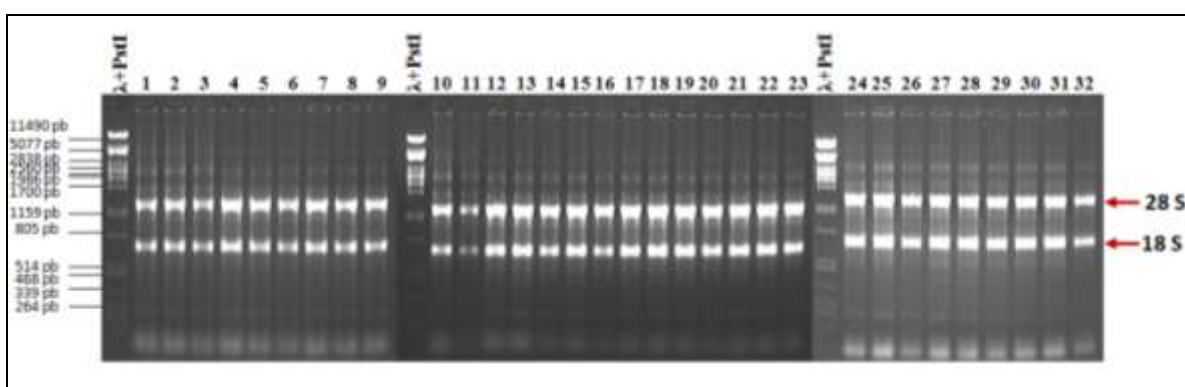


Figura 50: Electroforesis de RNA obtenido de células 3T3L1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con isotiocianato de guanidina de los RNAs extraídos de células 3T3L1 tratadas con GHs recombinantes obtenidas del protocolo de transfección. Como marcador de peso molecular se empleó al DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima *Pst*I.

B.2.- RT-PCR semicuantitativa PPAR γ , LPL y 36B4.

Luego de efectuada la síntesis de DNAc, se procedió a estandarizar las condiciones óptimas de cantidad de DNAc, temperatura y número de ciclos necesarios para realizar la amplificación semicuantitativa de cada uno de los marcadores de diferenciación adiposa.

- **Estandarización para 36B4:**

Inicialmente se realizó la estandarización de las condiciones óptimas necesarias para obtener un producto de calidad semicuantitativa para el gen de referencia 36B4 (fosfoproteína ribosomal ácida), cuyo RNAm es expresado de manera invariable en la célula, el cual fue empleado para normalizar los amplicones obtenidos a partir de los genes

de diferenciación adiposa.

a.-Temperatura óptima de amplificación.

En la fotografía (figura 51) son presentados los productos de PCR obtenidos para la amplificación del gen de referencia 36B4 luego de 35 ciclos y manteniendo constante la cantidad de material genético empleado como molde de la reacción, considerando cuatro diferentes temperaturas de alineamiento para los iniciadores de la PCR:

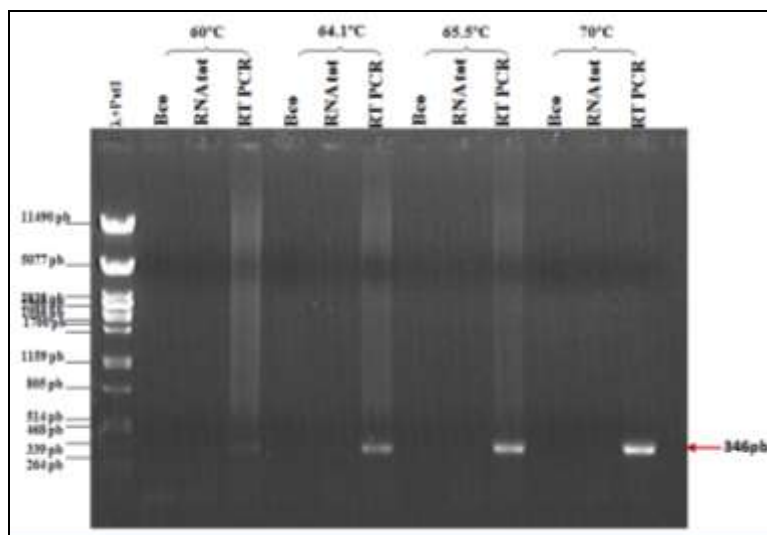


Figura 51: Curva de temperatura para amplificación por PCR del gen de referencia 36B4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el gen 36B4 a cuatro diferentes temperaturas de alineamiento, sobre DNAC de células 3T3L1. Mismo marcador de peso molecular que en la figura anterior.

Como se puede apreciar, el mejor producto es obtenido a una temperatura de alineamiento de 70°C. Sin embargo dado que ésta es demasiado alta y se encuentra próxima a la temperatura en que la Taq polimerasa produce la elongación de los productos, se decidió emplear 66°C como óptimo para la amplificación de este gen de referencia.

b.- Número de ciclos de amplificación.

En la figura 52, recuadro a, son observados los productos de PCR obtenidos para la amplificación del gen de referencia 36B4, al realizar la determinación del número de ciclos óptimo para una reacción de PCR semi cuantitativa, una vez fija la temperatura óptima de

alineamiento en 66°C y manteniendo constante la cantidad de cDNA empleado como molde de la reacción:

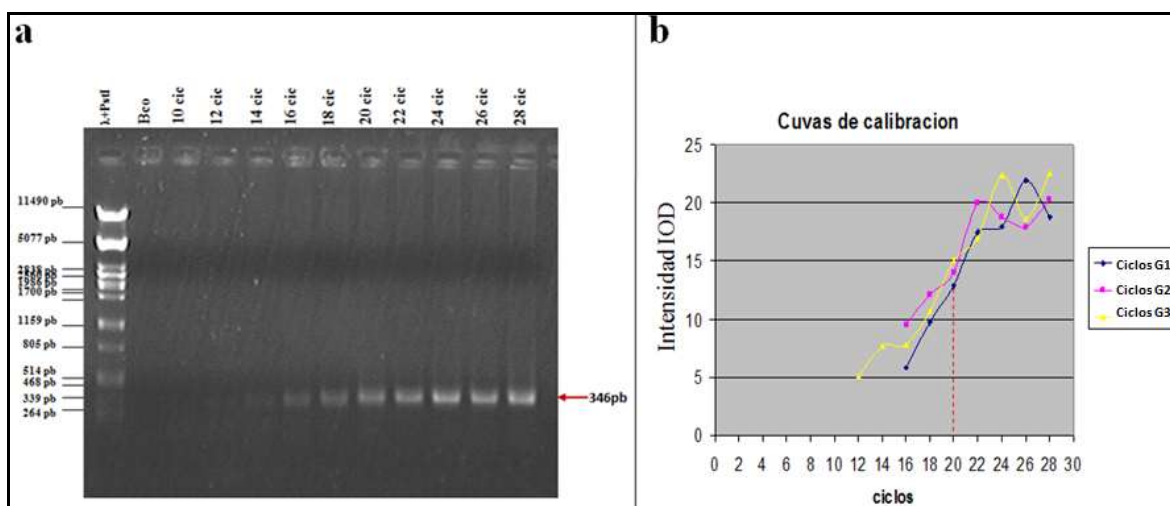


Figura 52: Curva de ciclos para amplificación por PCR del gen de referencia 36B4. (a) Electroforesis en gel 1% agarosa de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el gen 36B4 entre 10 y 28 ciclos de amplificado, sobre DNAc de células 3T3L1. Mismo marcador de peso molecular que en las figuras anteriores. (b) Gráfica del análisis densitométrico de los productos de PCR obtenidos en función del número de ciclos. La línea segmentada indica el número óptimo de ciclos necesarios para obtener un producto de PCR de calidad semicuantitativa.

El análisis densitométrico de los productos de PCR obtenidos a los distintos ciclos (figura 52b) permitió determinar que el número de ciclos necesarios para generar productos dentro de la fase exponencial de la amplificación corresponde a 20 ciclos.

c.- Cantidad de DNAc.

Ya fijadas la temperatura de alineamiento y el número de ciclos para el gen de referencia 36B4, se procedió a determinar la cantidad de material genético necesario para obtener un producto de calidad semicuantitativa (figura 53a).

A partir del análisis densitométrico (figura 53b) se pudo determinar que la cantidad de DNAc necesaria para obtener un producto de PCR adecuado, es la correspondiente a la obtenida a partir de 0.1 µg de RNA.

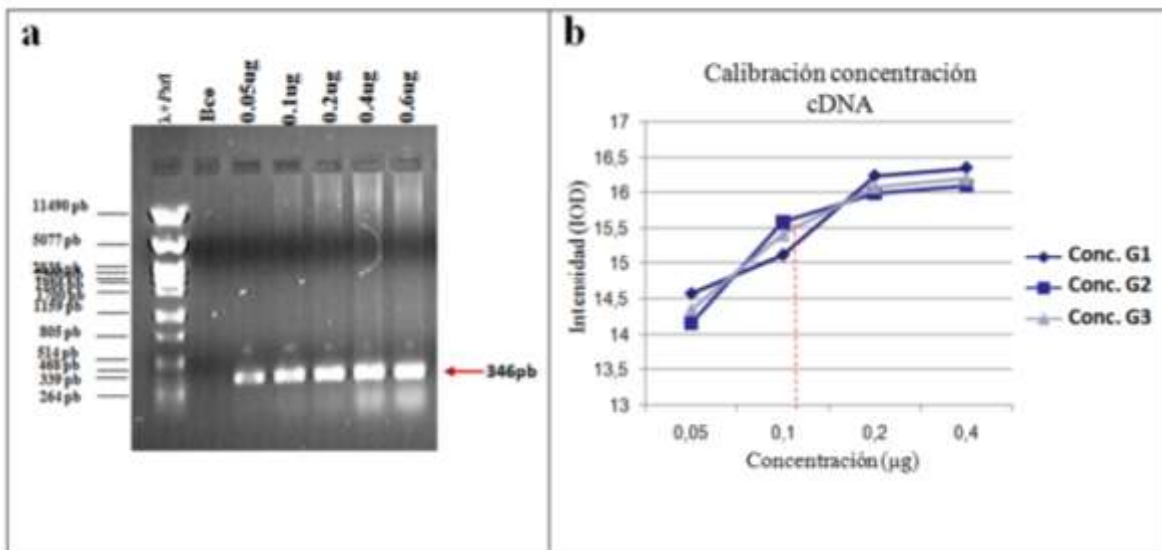


Figura 53: Curva de concentración DNAc para amplificación por PCR del gen de referencia 36B4. (a) Electroforesis en gel 1% agarosa de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el gen 36B4 empleando concentraciones crecientes de cDNA. Las cantidades indicadas en la parte superior corresponden al RNA utilizado para generar el DNAc de células 3T3L1. Mismo marcador de peso molecular que en las figuras anteriores. (b) Gráfica del análisis densitométrico de cada uno de los productos de PCR obtenidos en función de la cantidad de DNAc. La línea segmentada indica la concentración óptima necesaria para la reacción de amplificación.

- **Estandarización para PPAR γ y LPL**

Teniendo en cuenta la cantidad de DNAc definida para la amplificación del gen de referencia 36B4, se procedió a realizar la estandarización del número de ciclos óptimos y temperatura necesarios para realizar la amplificación de los genes marcadores de diferenciación adiposa PPAR γ y LPL (los cuales son expresados respectivamente en etapas tempranas y tardías de la diferenciación adiposa, participando en la diferenciación celular y el metabolismo de lípidos), que permita determinar diferencias cuantitativas en la expresión de los genes antes mencionados.

a.-Temperatura

Las condiciones óptimas de temperatura de alineamiento necesarias para obtener un producto de calidad para los marcadores de diferenciación adiposa PPAR γ y LPL, fueron determinadas realizando la amplificación en un rango de temperatura que va desde los 56°C a los 64°C (figuras 54a y 55a).

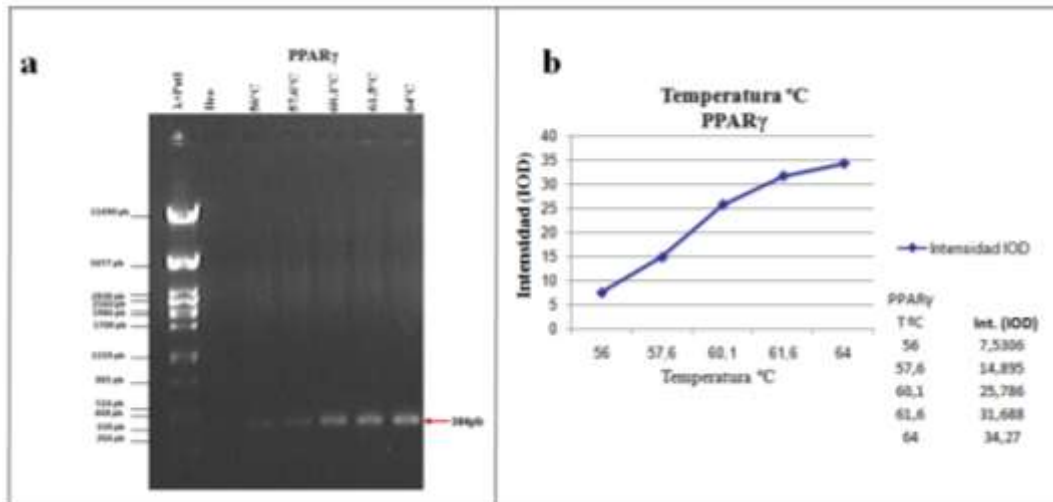


Figura 54: Curva de temperatura para amplificación por PCR del marcador de diferenciación PPAR γ . (a) Electroforesis en gel 1% agarosa de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el gen PPAR γ en un rango de temperaturas de alineamiento entre 56°C a 64°C, sobre DNAc de células 3T3L1 diferenciadas. Mismo marcador de peso molecular que en las figuras anteriores. (b) Gráfica del análisis densitométrico de los productos de PCR obtenidos en función de la temperatura.

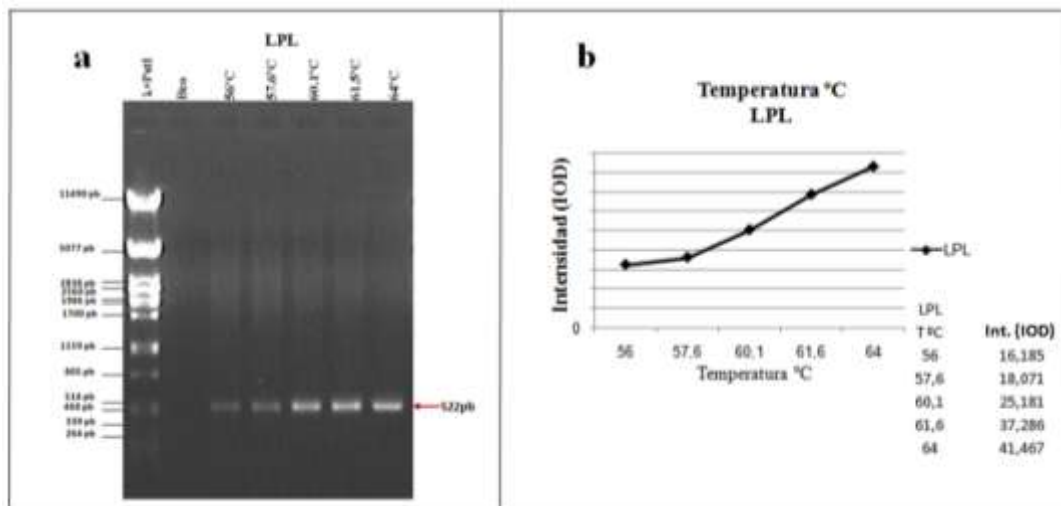


Figura 55: Curva de temperatura para amplificación por PCR del marcador de diferenciación LPL. (a) Electroforesis en gel 1% agarosa de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el gen LPL en un rango de temperaturas de alineamiento entre 56°C a 64°C, sobre DNAc de células 3T3L1 diferenciadas. Mismo marcador de peso molecular que en las figuras anteriores. (b) Gráfica del análisis densitométrico de los productos de PCR obtenidos en función de la temperatura.

Con la finalidad de unificar la temperatura de alineamiento, en base a las gráficas del análisis densitométrico de los productos de PCR (figuras 54b y 55b), se decidió emplear

62°C como el punto de compromiso en la amplificación de los marcadores de diferenciación PPAR γ y LPL.

b.- Ciclos.

En cuanto al número de ciclos las condiciones óptimas necesarias para obtener un producto de calidad de los marcadores de diferenciación adiposa PPAR γ y LPL, fueron determinadas en un rango de amplificación de 20 a 30 ciclos (figuras 56a y 57a).

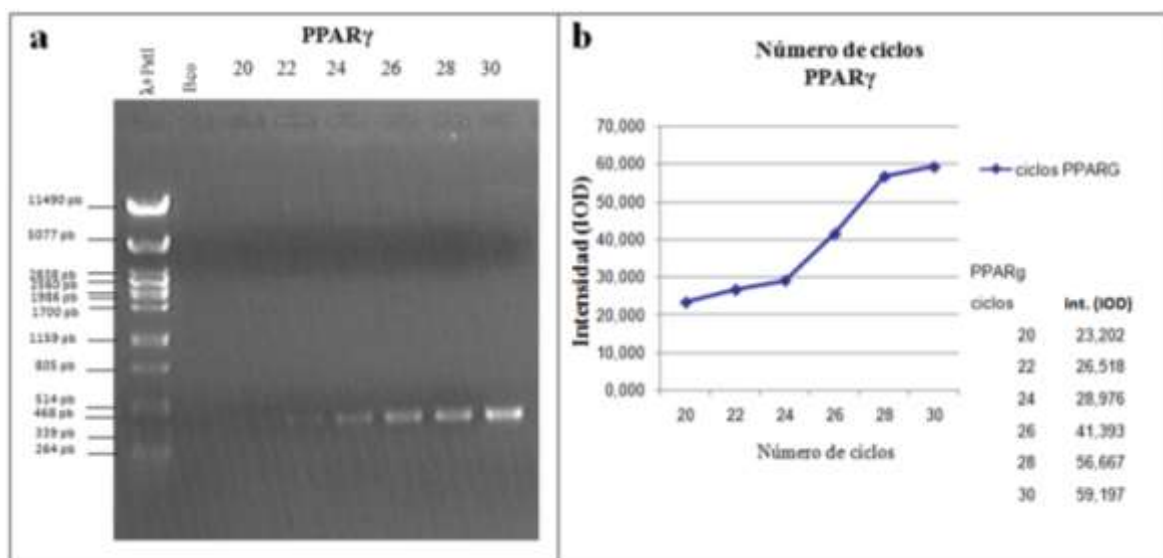


Figura 56: Curva de ciclos para amplificación por PCR del marcador de diferenciación PPAR γ . (a) Electroforesis en gel 1% agarosa de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el gen PPAR γ entre 20 y 30 ciclos de amplificado, sobre DNAc de células 3T3L1 diferenciadas. Mismo marcador de peso molecular que en las figuras anteriores (b) Gráfica del análisis densitométrico de los productos de PCR obtenidos en función del número de ciclos.

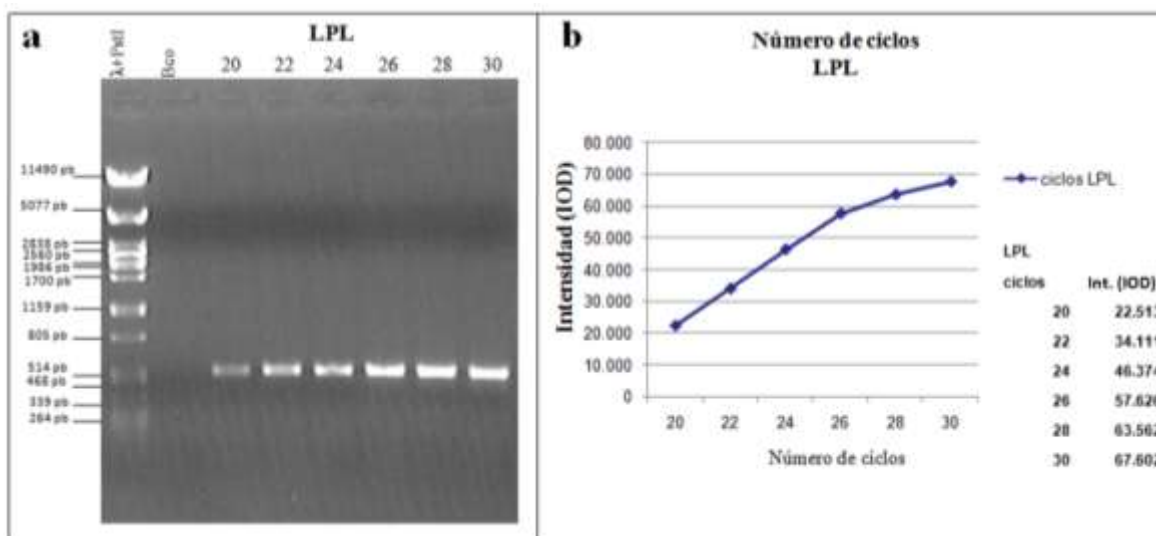


Figura 57: Curva de ciclos para amplificación por PCR del marcador de diferenciación LPL. (a) Electroforesis en gel 1% agarosa de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el gen LPL entre 20 y 30 ciclos de amplificado, sobre DNAC de células 3T3L1 diferenciadas. Mismo marcador de peso molecular que en las figuras anteriores. (b) Gráfica del análisis densitométrico de los productos de PCR obtenidos en función del número de ciclos.

Como se puede observar en los análisis densitométricos de las figuras 56b y 57b, en el caso de PPAR γ el óptimo fue considerado a 26 ciclos, mientras que para el marcador de diferenciación LPL se determinó que eran 24 ciclos.

• Resultados RT-PCR semicuantitativa de marcadores moleculares de diferenciación adiposa.

Una vez concluida la estandarización, se realizó la amplificación mediante la técnica de PCR para PPAR γ , LPL y 36B4, siguiendo las condiciones previamente definidas. A modo de ejemplo se presentan en la figura 58 los productos de PCR obtenidos para uno de los triplicados del ensayo.

El análisis densitométrico de los productos de PCR obtenidos por triplicado, provenientes de células tratadas con medio adipogénico (medio suplementado con GH recombinante obtenido a partir del protocolo de transfección de células HeLa) revelan que su intensidad es mayor que la originada a partir de células tratadas con los controles negativos del ensayo (medio definitivo, Opti-MEM, lipofectamina y el vector sin inserto de GH-N “MOCK”) (figura 59).

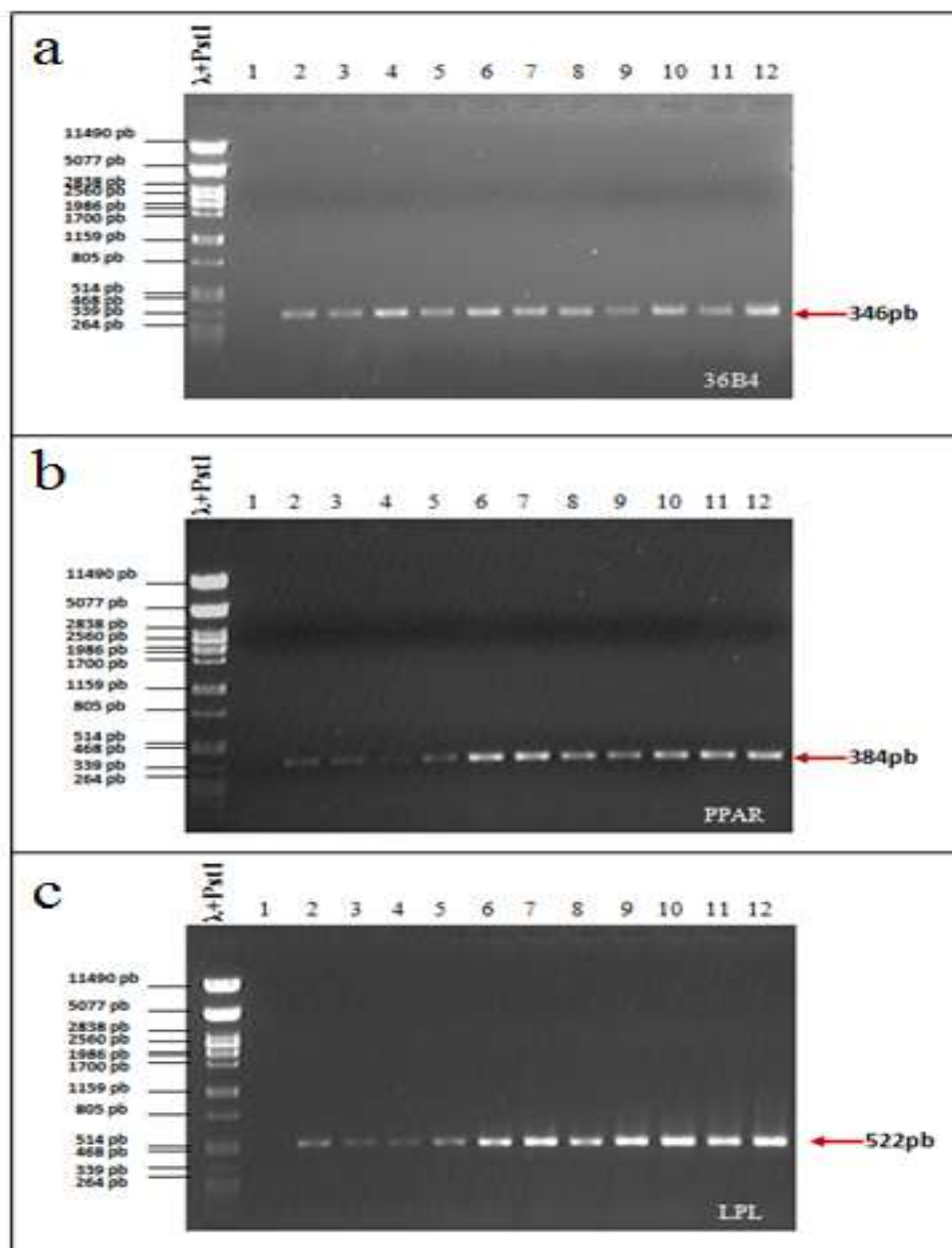


Figura 58: Marcadores moleculares de diferenciación adiposa. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los marcadores de diferenciación: (a) Electroforesis de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el gen de referencia 36B4. (b) Electroforesis de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el marcador de diferenciación PPAR γ . (c) Electroforesis de los productos obtenidos de la reacción de PCR efectuada para el marcador de diferenciación LPL. Como marcador de peso molecular fue empleado el mismo que en las figuras anteriores. Los números superiores corresponden a productos de muestras tratadas con los sobrenadantes de transfección con: (1) control negativo reacción de PCR; (2) Medio definitivo; (3) Opti-MEM; (4) Lipofectamina; (5) vector sin inserto “MOCK”; (6) hGHc; (7) hGH; (8) Chimpancé; (9) Gorila; (10) Mono Rhesus; (11) mono araña; (12) lémur.

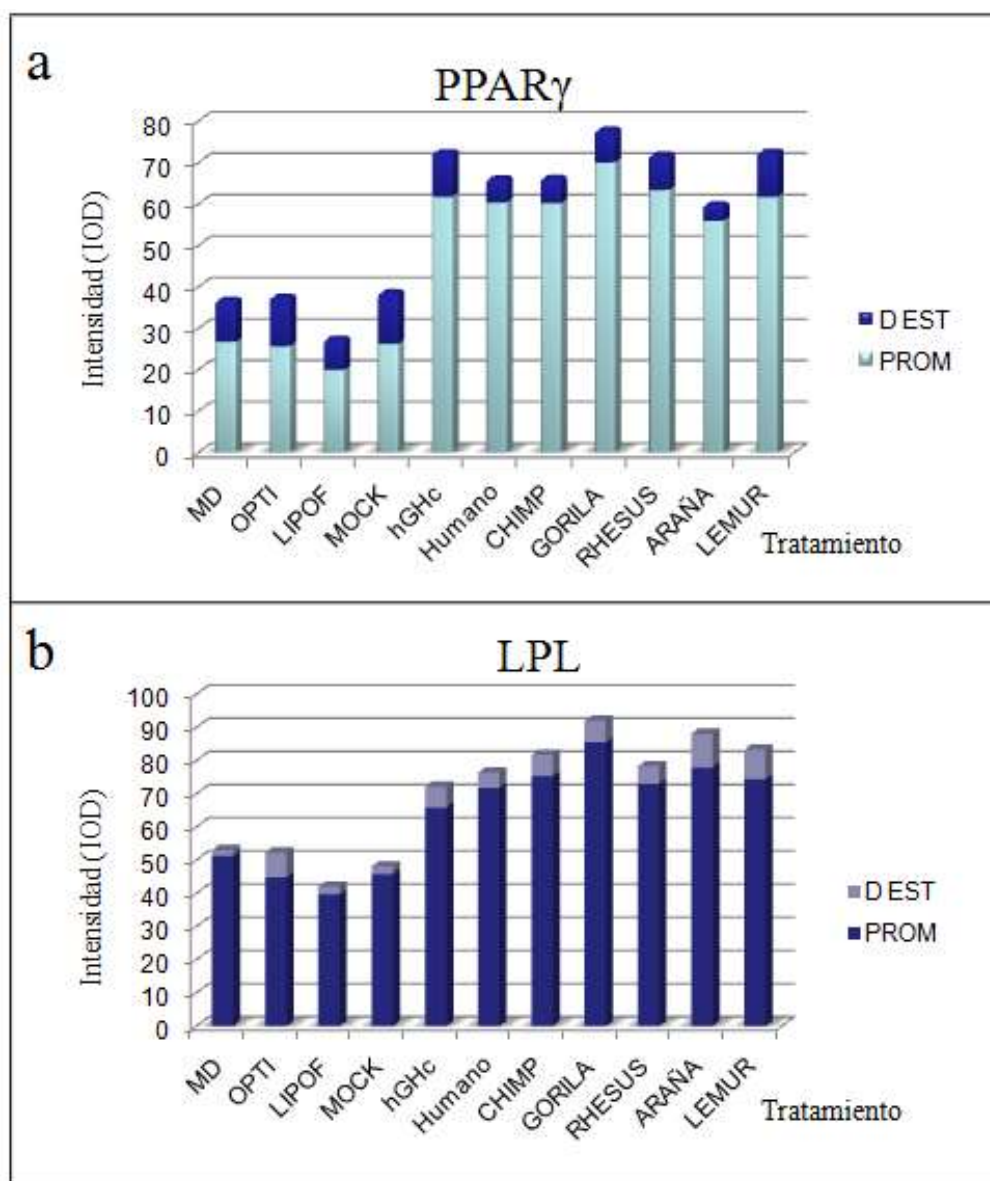


Figura 59: Gráfica análisis densitométrico marcadores moleculares de diferenciación adiposa en células 3T3L1 por tratamiento con GHs. En la gráfica las barras representan la intensidad detectada a partir de los productos de PCR obtenidos por triplicado para cada uno de los marcadores de diferenciación. Los tratamientos corresponden a: MD control negativo que corresponde a medio de cultivo definitivo; OPTI corresponde a medio suplementado con sobrenadante obtenido de tratamiento con Opti-MEMTM; LIPOF corresponde a medio de cultivo suplementado con lipofectamina; MOCK corresponde a medio suplementado con sobrenadante obtenido de transfección sin GH; hGHc, a medio suplementados con hGH comercial 40 ng/mL; Humano, a medio suplementado con hGH de transfección; CHIMP, a medio suplementado con GH-N-chimpancé de transfección; GORILA, a medio suplementado con GH-N-gorila; RHESUS, a medio suplementado con GH-N-mono rhesus de transfección; ARAÑA, a medio suplementado con GH-N-mono araña de transfección; LEMUR, a medio suplementado con GH-N-lémur de transfección. Los tratamientos con GHs recombinantes fueron realizados a una concentración final aproximada de 20ng/mL.

Como se puede observar en las gráficas, los tratamientos con las hormonas recombinantes obtenidas a partir de la transfección de células HeLa con cada uno de los vectores de expresión, fueron capaces de inducir diferenciación en la línea celular 3T3L1, con la misma eficiencia que el control positivo (medio suplementado con hGHc). El análisis estadístico de los resultados reveló mediante prueba T y análisis de varianza (ANOVA), que todas las hormonas recombinantes ejercen un efecto adipogénico significativamente mayor que el control negativo ($P < 0.05$), pero que no dista del efecto producido por el control positivo. En cuanto al análisis de varianza efectuado sobre el análisis densitométrico en el producto de PCR obtenido para LPL, se observa que el tratamiento con el control positivo, si bien induce un efecto adipogénico mayor que el control negativo, éste no es significativo ($P > 0.05$).

C.- Proliferación celular.

La actividad lactogénica de las diferentes GHs analizadas en este trabajo fue medida por el efecto de proliferación celular inducida sobre la línea celular Nb2. El resultado del conteo celular obtenido por cuadruplicado para cada tratamiento es presentado en la gráfica de la figura 60.

Como se puede observar en la gráfica, los tratamientos realizados con los medios de cultivo suplementados con una concentración de 0.001nM de las hormonas recombinantes, obtenidas a partir de la transfección de células HeLa con cada uno de los vectores de expresión, fueron capaces de inducir proliferación en la línea celular Nb2. El análisis estadístico de los resultados reveló mediante prueba T y análisis de varianza (ANOVA), que todas las hormonas recombinantes ejercen un efecto proliferativo significativamente mayor que el control negativo ($P < 0.05$), que no dista del efecto producido por el control positivo PRL. Sin embargo, en el caso de los tratamientos efectuados con GH-N del mono rhesus y GH-N del lémur, éste indica que el efecto proliferativo inducido por estas hormonas es significativamente mayor incluso que el producido por el control positivo ($P < 0.05$).

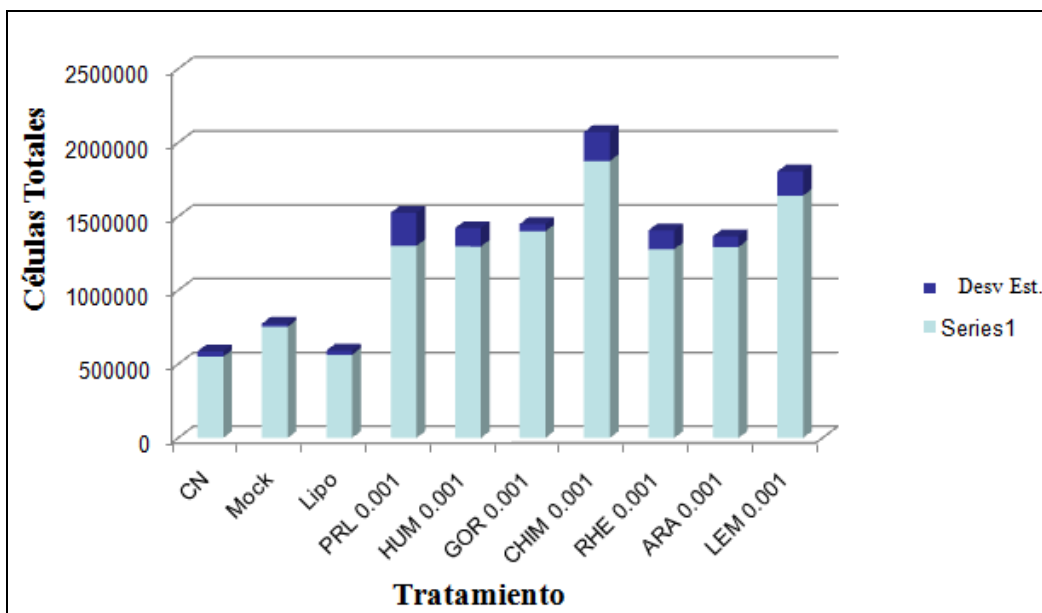


Figura 60: Proliferación celular inducida en células Nb2 por tratamiento con GHs. En la grafica las barras representan el número de células totales obtenidos por conteo con cámara Neubauer para cada uno de los tratamiento de células Nb2 en cultivo, con medios controles y suplementados con GHs recombinantes. Los tratamientos corresponden a: CN, control negativo medio de cultivo; Mock, corresponde a medio suplementado con sobrenadante obtenido de transfección sin GH; Lipo, a medio de cultivo suplementado con lipofectamina; PRL, a medio suplementados con PRL humana comercial; HUM medio suplementado con hGH de transfección; GOR, a medio suplementado con GH-N-gorila; CHIMP, a medio suplementado con GH-N-chimpancé de transfección; RHE, a medio suplementado con GH-N-mono rhesus de transfección; ARA, a medio suplementado con GH-N-mono araña de transfección; LEM, a medio suplementado con GH-N-lémur de transfección. Los tratamientos fueron realizados a una concentración de 0.001nM hormona en el medio de cultivo.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

7.1.- Subclonación molecular de GHs hipofisiarias.

En el presente trabajo se propuso subclonar en un vector de expresión para células de mamíferos, las UTs de los genes para las GHs hipofisiarias de especies representativas en la escala evolutiva de primates, con la finalidad de fabricar las versiones recombinantes de las GHs correspondientes y someterlas por primera vez a un estudio comparativo de sus potencialidades codificantes, a nivel de RNAm y proteínas, y de actividad biológica de sus productos proteicos. La esperanza es que tales comparaciones permitan inferir las razones fisiológicas de los cambios que subyacen en la dramática evolución que experimentó la GH en primates.

Para lograrlo, fueron obtenidos del Laboratorio de Genómica y Bioinformática los plásmidos portadores de los genes de interés, así como los archivos con sus secuencias nucleotídicas. En una etapa inicial fue verificada la identidad de estos plásmidos recombinantes mediante corte con la enzima de restricción *Pst*I, y los resultados obtenidos fueron comparados con el análisis bioinformático efectuado sobre cada una de las secuencias proporcionadas. Esto permitió confirmar la orientación de cada UT en su respectivo plásmido portador y definir la mejor estrategia a utilizar en la subclonación de ellas, en el vector de expresión para células eucariotas pcDNA3.1 H+, paso que no estuvo exento de dificultades, dada la heterogeneidad en los mapas de restricción del material de partida.

En los casos particulares de las GHs pertenecientes a gorila y lémur, la tarea fue ardua, pues la ausencia de secuencias en las bases de datos, necesarias para efectuar una comparación eficiente, dificultó aun más el realizar un análisis fidedigno y definir la estrategia adecuada de subclonación. Esta limitante se solventó con esfuerzos adicionales para caracterizar dichos genes.

7.2.- Potencial transcripcional de GHs hipofisiarias.

En el caso del humano, el gen GH-N presenta sitios de empalme alternativo que permiten generar, fuera del mensajero principal, hasta otras cuatro variantes de menor tamaño (cuadro 8 en resultados). Para las restantes GHs analizadas en este trabajo, el análisis bioinformático fino de cada una de sus secuencias, sustentado en la comparación con las observaciones ya realizadas sobre los RNAm originados en el gen humano, permitió definir para cada gen del resto de los primates aquí estudiados la misma posibilidad de generar las eventuales cinco variantes de RNAm. Esta afirmación se fundamenta en el hecho de que los sitios donadores y aceptores de empalme alternativo de los intrones génicos se han conservado en todos los genes analizados.

Para confirmar este supuesto, los DNAs obtenidos a partir de la retrotranscripción del RNA total extraído de células HeLa sometidas al protocolo de transfección con los vectores portadores de las UT de interés, fueron amplificados con iniciadores oligonucleotídicos específicos y resueltos mediante electroforesis en gel (figura 45). En cada caso fue observada una banda intensa que presenta el patrón de migración electroforética esperado para el RNAm principal, acompañada de otros productos de menor tamaño e intensidad que pudieran corresponder a formas alternativas de este RNAm.

Otro ensayo realizado para detectar la presencia de especies alternativas de los RNAm de GHs fue la hibridación tipo Northern. Para llevarlo a cabo fue construida una sonda, empleando como molde una región del DNA del gorila (figura 20 y 46) que está conservada entre las especies analizadas, la cual fue marcada e hibridada contra los RNAs extraídos de las células HeLa transfectadas, resueltos mediante electroforesis y transferidos a una membrana de nylon. En este caso el resultado fue pobre, en comparación con la RT-PCR, siendo posible, no obstante, detectar a los mensajeros principales de cada uno de los genes analizados (figura 48).

La falta de detección mediante hibridación tipo Northern de las potenciales especies de RNAm, observadas en la detección por PCR y en la especie principal de RNAm de lémur, pudo ser debida a distintas causas:

- Problemas con la sonda:

Si bien la sonda fue diseñada empleando la región más conservada de las secuencias, correspondientes a los exones 4 y 5 de los genes, ésta no fue la más idónea, ya que tendrá una menor afinidad por todas aquellas isoformas generadas por cambios nucleotídicos o por pérdida de las regiones de los exones en cuestión, como puede ser observado en algunas de las potenciales especies de RNAm de GHs generados por empalme alternativo, por ende una disminución en la sensibilidad de la detección. Una eventual forma de solucionar dicho problema es emplear una temperatura de hibridación más baja haciéndola menos astringente, lo que permite la unión de la sonda a parte de la secuencia de reconocimiento, sin embargo esto también favorecería la unión inespecífica de la sonda y la detección de mensajeros erróneos, generando fondo en el ensayo. Otra forma de realizar una mejor detección hubiera sido empleando una sonda de menor tamaño, que sólo se hibridara con el exón final de cada uno de los genes (exón 5) y que es el más conservado en cada una de las isoformas de RNAm predichas para cada una de las GHs analizadas en este trabajo, en base a la comparación con las especies de RNAm descritas para la GH-N humana. La realización de este ensayo, Sin embargo, se vio dificultada por la cantidad de RNA necesario para cada ensayo (20 a 40 μ g de RNA total), y por la escasa sensibilidad proporcionada por el Kit comercial empleado en la detección, que se vio reflejada en la elevada cantidad de sonda requerida y en los tiempos extensos de exposición, que favorecían la aparición de fondo en las detecciones.

- Inexistencia de otras especies de RNAm de GHs:

La detección sólo de la forma principal del RNAm de GH-N de los monos y simios investigados en este trabajo, puede ser originada debido a que este RNAm se esté expresado abrumadoramente en el modelo celular empleado, en comparación con sus especies alternativas. Ello implica insuficiente cantidad de las últimas para realizar una buena detección, escapándose a la sensibilidad del ensayo. Esto a diferencia de lo observado en los controles del ensayo, correspondientes a los productos obtenidos a partir de la transfección de las células HeLa con los vectores portadores, por separado, de las variantes de RNAm de GH-N humana que generan las isoformas proteicas de 20 y 22 kDa,

los cuales fueron detectados de manera eficiente dado que cada uno genera sólo una especie de RNAm. Estos resultados correlacionan con lo reportado en cuanto a expresión de hGH en hipófisis se refiere (Masuda y cols., 1988; Chen y cols., 1989) y con el resultado obtenido por RT-PCR (figura 45), en el cual se pudo apreciar que el porcentaje relativo de las eventuales variantes observadas es mucho menor en comparación al mensajero principal. Si comparamos lo observado a nivel de RNAm con los resultados obtenidos a nivel proteico, encontramos una nueva discrepancia; mediante el Western blot fue posible detectar en cada caso al menos dos isoformas proteicas con similar abundancia relativa, los que nos hace suponer la existencia de por lo menos dos especies de RNAm. Por otra parte, si contrastamos estos resultados con los previamente obtenidos por nuestro grupo a partir de los genes de hGH-N y hCSH (Reséndez y cols., 1990), encontramos una discrepancia adicional; en el caso de las hGH-N fue posible detectar abundancias proteicas relativas que correlacionan con lo niveles de RNAm de hGH-N presentes en las células COS-7 empleadas en ese trabajo, observándose menos representada la variante de RNAm que genera la isoforma proteica de 20kDa, la cual es encontrada en baja concentración en los medios recuperados de esas células. En el caso de las CSH, son reportadas isoformas proteicas de 22 y 25 kDa, siendo esta última la con mayor abundancia. Sin embargo las diferencias en los resultados obtenidos para las GH-N en ambos trabajos pueden deberse a potenciales modificaciones postraduccionales del tipo corte proteolítico, experimentado por los productos proteicos en el modelo celular HeLa empleado en este trabajo.

Por otra parte, aun no existen reportes que describan la existencia de variantes del RNAm de GH-N originados por empalme alternativo en las nuevas especies analizadas, que permitan avalar la existencia de ellos, salvo los descritos para el caso de humano. En este caso, la mejor forma para realizar una confirmación eficiente de las potenciales isoformas de RNAm para GHs ya obtenidas, consistiría eventualmente en secuenciar cada uno de sus productos de PCR.

7.3.- Potencial traduccional de GHs

Para determinar el potencial traduccional de cada GH, se analizó la presencia de proteínas en los medios de cultivo obtenidos de las células HeLa transfectadas. Inicialmente el análisis de GHs mediante RIA solamente permitió cuantificar la hormona presente en los

sobrenadantes obtenidos a partir de la transfección con el GH-N humano y el del gorila (fig. 41), reflejando una elevada especificidad de reconocimiento del anticuerpo empleado en este tipo de detección. Estos anticuerpos son generalmente monoclonales y están orientados al reconocimiento de epítopes específicos, como son los sitios de interacción de la GH con GHR (Strasburger y cols., 1996). Este tipo de anticuerpos presentan también reacción cruzada con hormonas estructuralmente semejantes en lo que a dominios se refiere, como es el caso de las GH pertenecientes a grandes monos, especies muy emparentadas con el humano.

Dado el escaso valor de la técnica de detección de RNAm empleada en nuestro modelo de investigación, se decidió realizar la detección de GH y sus isoformas mediante Western blot (figura 42). A partir de este análisis fue posible detectar la presencia de dos proteínas para la mayoría de las GHs, que correlacionan con las isoformas de 20 kDa y 22 kDa, mismas que ya han sido descritas para el caso de la hGH-N. También fue posible observar la presencia de dímeros y multímeros, con un patrón de migración electroforética superior a 40 kDa, que corresponden a un 20% o 30% de la detección final. Por otra parte, cabe destacar que en el caso de lémur y mono rhesus, fue posible detectar isoformas con patrones de migración electroforética correspondiente a aproximadamente 24 kDa, originados en principio por glicosilación de la proteína madura, según se infiere de los tratamientos con desglicosilasas a los que fueron sometidas estas muestras y que les reducen su masa aparente (fig. 43). Estos resultados correlacionan con lo previamente descrito para la hGH de 22kDa, para la cual se ha detectado una isoforma glicosilada de 24 kDa (Haro y cols., 1996), y para la hGH-V en cual se ha observado la presencia de una isoforma glicosilada de 25kDa, originada por glicosilación del aminoácido asparragina en la posición 140 de la proteína madura (Ray y cols., 1989; Frankenne y cols., 1990).

Si bien el ensayo de Western blot permitió detectar la presencia de las hormonas recombinantes de manera cualitativa, para inferir sus abundancias relativas fue necesario realizar el análisis densitométrico de estos resultados y correlacionarlos con los obtenidos previamente a partir del RIA, con la finalidad de determinar la concentración aproximada de GH presente en los medios y así poder definir las cantidades a emplear en los posteriores ensayos de actividad biológica.

7.4.- Actividad biológica comparativa de las GHs.

En la actualidad se cuenta con diversos modelos celulares que permiten evaluar *in-vitro* la actividad biológica de GHs:

- Modelo somatogénico: Se seleccionó el adipogénico, dado que la GH presenta capacidad promotora de la diferenciación en células que expresan su receptor, como es el caso de los preadipocitos de la línea 3T3L1.
- Modelo lactogénico: Se seleccionó al que mide la capacidad de estimular la proliferación celular en cultivos que expresan el receptor de prolactina, como es el caso de las células Nb2 de linfoma de rata.

En este trabajo se evaluó la capacidad de las GHs de inducir diferenciación adiposa, a nivel de cambios en la morfología de las células de fibroblastos de ratón 3T3L1 en cultivo y de su producción de triglicéridos. En ellas podemos observar el notorio cambio morfológico de las células en cultivo, pasando de fibroblastos, como se puede apreciar en la figura 49 de A a C que corresponde a los controles del ensayo, a adipocitos maduros con gotas de lípidos en su interior, como es el caso de las células sometidas a tratamiento con GH presentes en las fotografías de la figura 49 D a J. Si bien los controles negativos del ensayo (fig 49 de A a C) no fueron tratados con hormonas recombinantes, por lo que se esperaba ausencia de conversión adiposa, puede observar sólo en algunas células diferenciación a adipocito. Este cambio morfológico puede verse ocasionado por la presencia de algunas células comprometidas a diferenciación presentes al momento de realizar el ensayo, remanentes en los pasajes previos a los que fue sometido el cultivo, pero que no presentan mayor significancia en el resultado final del experimento, considerándose como fondo del ensayo. Estos resultados fueron confirmados posteriormente mediante la PCR semicuantitativa de los marcadores de diferenciación adiposa PPAR γ y LPL. En ambos casos se pudo apreciar que, cada una de las hormonas recombinantes obtenidas a partir de la transfección, presentaron la capacidad de inducir la diferenciación tan eficientemente como el control positivo utilizado en los ensayos, que correspondía al estándar de GH humana comercial (hGHc), viéndose reflejado en la mayor intensidad de los amplicones obtenidos por PCR para los respectivos marcadores en las células sometidas

a tratamiento con las hormonas recombinantes, y que fue confirmado mediante el análisis estadístico de prueba T y ANOVA, versus la baja intensidad apreciada en los controles negativos del ensayo, originada por la expresión basal de éstos genes en las células en cultivo (fondo del ensayo) (fig. 58). Sin embargo, como es indicado en los resultados, las concentraciones empleadas de las hormonas recombinantes equivalen teóricamente a la mitad de la empleada del control positivo (20 ng/mL vs 40ng/mL), lo que nos hace pensar que la potencia de las hormonas obtenidas en este trabajo sería mayor que la del estándar comercial empleado. Al respecto es necesario recordar que, dada la imposibilidad de emplear el RIA para realizar una cuantificación adecuada, fue necesario estimar la cantidad de hormona presente en base al análisis densitométrico de los resultados obtenidos a partir del Western blot, pudiendo deberse este resultado a una sobrestimación de la concentración de GH presente en los medios. Por otro lado la presencia de gran cantidad de dímeros y multímeros, como se observa especialmente en el caso de la hGHc empleada como control positivo del ensayo (fig. 42), va en demérito de los niveles presentes de la isoforma fisiológica, lo que puede afectar la actividad final de esta hormona, haciendo necesario agregar una mayor concentración de la hGHc para obtener similares resultados a los observados con las restantes hormonas analizadas en este trabajo. Esto se apoya en la observación de los resultados obtenidos al analizar el marcador de diferenciación LPL, para el cual el análisis de varianza realizado sobre las densitometrías de los productos de PCR obtenidos para dicho gen, arrojó que el tratamiento con el control positivo (hGHc), si bien induce un efecto adipogénico mayor que el control negativo, éste efecto no es significativo ($P>0,05$).

Teniendo en cuenta el análisis de los marcadores de diferenciación adiposa mediante RT-PCR, se observó que el efecto diferenciador de las GHs recombinantes se refleja notoriamente mejor en PPAR γ (fig 59), dado que éste se expresa más tempranamente en las células tratadas, en comparación con la expresión tardía de LPL (Rodríguez y cols., 2004).

Por otra parte en el modelo lactogénico antes descrito, las hormonas recombinantes produjeron una notoria proliferación celular, de manera comparable a la inducida por cantidad semejante del testigo positivo, correspondiente a PRL humana comercial (fig. 60). Sin embargo, para el caso de los tratamientos efectuados con las hormonas recombinantes provenientes de los monos rhesus y lémur, fue observado y confirmado por el análisis

estadístico de prueba T y ANOVA, que el efecto proliferativo inducido por estas hormonas es significativamente mayor que el producido por el control positivo ($P < 0.05$).

Retomando el análisis bioinformático y teniendo en cuenta lo ya reportado en la literatura en base a los residuos aminoacídicos a los cuales se les ha atribuido una función importante, en el caso de lémur se descubrió que en la posición 44 de la hormona no esta presente el residuo de Phe (Phe⁴⁴), por lo que se esperaría una reducida actividad lactogénica según lo señalado por Peterson y Brooks (1997). Sin embargo, en trabajos previos de nuestro laboratorio con GH de perro (Ascacio y col., 2004) la cual, al igual que en el caso del lémur, no presenta la Phe en la posición 44 de la proteína madura, se observó, en ensayos in-vitro realizados en la línea celular Nb2, que ésta hormona si presentaba actividad lactogénica. Cabe destacar que tanto el perro como el lémur están dentro del grupo de prosimios y vertebrados (figura 28), grupo en el que observamos la ausencia de la Phe⁴⁴. En ambos casos y en trabajos independientes se pudo demostrar que estas hormonas presentan actividad lactogénica en el mismo modelo celular, resultado que se contrapone a lo expuesto en el trabajo mencionado inicialmente.

Recapitulando los ensayos de actividad biológica, los resultados obtenidos permitieron descubrir que todas las GHs analizadas son activas en los modelos celulares empleados para su caracterización. Sin embargo, estos son sustentados en la premisa de la capacidad presentada por las GHs de interactuar, eficientemente y mostrando una elevada afinidad, con las proteínas que fungen como receptores en las especies evolutivamente inferiores utilizadas en los bioensayos (Souza y cols., 1995), en este caso representados por dichos receptores de ratón (línea celular 3T3L1) y rata (línea celular Nb2). Al respecto se puede señalar que una mejor aproximación para abordar la funcionalidad de las hormonas recombinantes generadas, sería determinar su actividad directamente en modelos celulares provenientes de las mismas especies estudiadas, con la finalidad de enfrentar las GHs a sus propios receptores (GHR), enfoque que se vio imposibilitado en nuestro caso, dada la carencia de dichas líneas celulares.

En resumen, con las estrategias de bioinformática, biología molecular y celular empleadas en este trabajo, fue posible determinar y comparar los potenciales transcripcional y traduccional para cada uno de los genes de las GH-Ns analizadas y el funcional de sus productos proteicos, como se ha concentrado en el cuadro 11 de la sección

de conclusiones.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que:

8.1.- Al ser transfectadas en la línea celular HeLa, las unidades transcripcionales GHs previamente subclonadas en el vector de expresión pcDNA3.1 H+, son capaces de generar el RNAm principal y otras especies alternativas de éste, como fue observado en el ensayo de RT-PCR sobre RNA de células HeLa sometidas al protocolo de transfección.

8.2.- La identificación de proteínas de 22KDa, secretadas en los medios de cultivo de las células transfectadas, correlacionan con la presencia de un mensajero principal que origina dicha proteína. Por otra parte, la presencia de isoformas proteicas de menor tamaño puede ser causada por modificaciones postraduccionales del tipo corte proteolítico sobre la proteína principal en nuestro modelo de estudio.

8.3.- Las variaciones en los patrones de migración electroforética observados para las GHs del lémur y mono rhesus en el ensayo de Western blot, son causados por modificaciones postraduccionales del tipo de glicosilación, presentes en la isoforma más pesada de esta proteína.

8.4.- Los ensayos de actividad biológica reflejan que las diferentes hormonas analizadas en este trabajo son activas, siendo estas comparables con las actividades producidas por los respectivos controles de cada análisis, consistentes en las versiones comerciales de las hormonas de origen humano.

8.5.- En el caso de la GH del lémur la ausencia de la Phe⁴⁴ hacía suponer una disminución de su actividad lactogénica, sin embargo se obtienen resultados que correlacionan con los obtenidos tanto para el control de PRL humana comercial, así como para el resto de las GHs analizadas, y con los previamente reportados por nuestro grupo de investigación.

8.6.- El análisis comparativo y funcional de los genes de GH de diferentes especies en la escala evolutiva de primates permitió completar el siguiente cuadro que concentra los descubrimientos aportados por nuestro trabajo:

Cuadro 11: Resultados de los análisis comparativos de las unidades transcripcionales de las GHs estudiadas.

Especie de origen del gen GH-N		RNAm	Proteínas		Actividad Biológica	
		Variantes	Isoformas?	Modificada?	Adipogénesis	Lactogénesis
	Humano	2^a	2^a	No	Si	Si
GM	Chimpance	* 1^b	2^b	No	Si	Si
	Gorila	* 1^b	2^b	No	Si	Si
VM	Mono Rhesus	* 1^b	2^b	Si	Si	Si
NM	Mono Araña	* 1^b	2^b	No	Si	Si
PS	Lémur	* 1^b	4^b	Si	Si	Si

GM: Grandes monos; VM: Viejo Mundo; NM: Nuevo Mundo; PS: Prosimio

a.- Resultados previamente reportados.

b.- Resultados obtenidos en este trabajo.

(*) La identificación realizada en este trabajo mediante Northern blot permitió detectar sólo el RNAm principal de GH-N, sin embargo mediante RT-PCR se observaron una serie de bandas con intensidad menor a la correspondiente al RNAm principal, con patrones de migración electroforética diferentes a los del RNAm principal, que pueden eventualmente corresponder a variantes.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN and Carter-Su C, 1993. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74(2): 237-44.

Argetsinger L S and Carter-Su C, 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.* 76: 1089 - 1107.

Ascacio JA and Barrera HA, 2004. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene* 340(2): 261-6.

Barrera-Saldana HA, Robberson DL and Saunders GF, 1982. Transcriptional products of the human placental lactogen gene. *J. Biol. Chem.* 257: 12399 - 12404.

Barrera-Saldana HA, 1998. Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. *Gene* 211(1): 11-8.

Barsh GS, Seeburg PH and Gelinas RE, 1983. The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus. *Nucleic Acids Res.* 11: 3939 - 3958.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N and Kelly PA, 1998. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocr. Rev.* 19(3): 225 -268.

Campbell GS, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR and Carter-Su C, 1992. Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267: 6074 - 6080.

Carter-Su C, Schwartz J and Smit LS, 1996. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 187-207.

Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE and Seeburg PH, 1989. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4(4): 479-97.

Colosi P, Ogren L, Thordarson G and Talamantes F, 1987. Purification and partial characterization of two prolactin-like glycoprotein hormone complexes from the midpregnant mouse conceptus. *Endocrinology* 120: 2500.

DeNoto FM, Moore DD and Goodman HM, 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 9: 3719 - 3730.

De-Vos AM, Ultsch M and Kossiakoff AA, 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255: 306 - 312.

Farmer SR, Zuo Y and Qiang L, 2006. Activation of CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) α Expression by C/EBP β during Adipogenesis Requires a Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ -associated Repression of HDAC1 at the *C/ebp α* Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* 281: 7960 - 7967.

Fiddes JC, Seeburg PH, DeNoto FM, Hallewell RA, Baxter JD and Goodman HM, 1979. Structure of Genes for Human Growth Hormone and Chorionic Somatomammotropin. *PNAS* 76: 4294 - 4298.

Fleenor D, Oden J, Kelly PA, Mohan S, Alliouachene S, Pende M, Wentz S, Kerr J and Freemark M, 2005. Roles of the Lactogens and Somatogens in Perinatal and Postnatal Metabolism and Growth: Studies of a Novel Mouse Model Combining Lactogen Resistance and Growth Hormone Deficiency. *Endocrinology* 146: 103 - 112.

Fleming WH, Murphy PR, Murphy LJ, Hatton TW, Matusik RJ and Friesen HG, 1985. Human growth hormone induces and maintains c-myc gene expression in Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 117: 2547.

Forsyth IA and Wallis M, 2002. Growth hormone and prolactin--molecular and functional evolution. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 7(3): 291-312.

Foster CM, Shafer JA, Rozsa FW, Wang XY, Lewis SD, Renken DA, Natale JE, Schwartz J and Carter-Su C, 1988. Growth hormone promoted tyrosyl phosphorylation of growth hormone receptors in murine 3T3-F442A fibroblasts and adipocytes. *Biochemistry* 27(1): 326-34.

Frankenne F, Rentier-Delrue F, Scippo ML, Martial J and Hennen G, 1987. Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 635 - 637.

Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J and Hennen G, 1998. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66(6):1171-1180.

Freemark M, Fleenor D, Driscoll P, Binart N and Kelly PA, 2001. Body Weight and Fat Deposition in Prolactin Receptor-Deficient Mice. *Endocrinology* 142: 532.

Galsgaard ED, Nielsen JH and Møldrup A, 1999. Regulation of Prolactin Receptor (PRLR) Gene Expression in Insulin-producing Cells. *J. Biol. Chem.* 274: 18686.

Green H and Zezulak KM, 1985. Specificity of gene expression in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 5: 419 - 421.

Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA and Martial JA, 1996. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr. Rev.* 17: 385.

Golos TG, Durning M, Fisher JM and Fowler PD, 1993. Cloning of four growth hormone/chorionic somatomammotropin-related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the rhesus monkey placenta. *Endocrinology* 133: 1744.

Gout PW, Beer CT and Noble RL, 1980. Prolactin-stimulated Growth of Cell Cultures Established from Malignant Nb Rat Lymphomas. *Cancer Res.* 40: 2433 - 2436.

Green H and Kehinde O, 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7(1): 105-13.

Gonzalez R, Revol de Mendoza A, Esquivel D, Corrales G, Rodríguez I, Gonzalez V, Davila G, Cao Q, de Jong P, Fu YX and Barrera-Saldana HA, 2006. Growth hormone locus expands and diverges after the separation of New and Old World Monkeys. *Gene* 380(1): 38-45.

Handwerger S and Freemark M, 2000. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 13(4): 343-56.

Haro LS, Lewis UJ, García M, Bustamante J, Martínez AO and Ling NC, 1996. Glycosylated human growth hormone (hGH): a novel 24kDa hGH-N variant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228(2):549-56.

Harper ME, Barrera-Saldana HA and Saunders GF, 1982. Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am. J. Hum. Genet.* 34(2): 227-34.

Jacquemin P, Oury C, Peers B, Morin A, Belayew A and Martial JA, 1994. Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen. *Mol. Cell. Biol.* 14: 93 - 103.

Juarez E, Castro F, Guerra NE, Resendez D, Martinez HG, Barrera-Saldana HA and Kuri W, 1999. Functional domains of human growth hormone necessary for the adipogenic activity of hGH/hPL chimeric molecules. *J. Cell Sci.* 112: 3127 - 3135.

Karin M, Theill L, Castrillo JL, McCormick A and Brady H, 1990. Cell type specific expression of the growth hormone gene and its control by GHF-1. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 66(12): 1205-20.

Kuri-Harcuch W and Green H, 1978. Adipose Conversion of 3T3 Cells Depends on a Serum Factor. *PNAS* 75: 6107 - 6109.

Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Hammonds RG, Collins C, Henzel WJ, Barnard R, Waters MJ and Wood WI, 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330(6148): 537-43.

Li Y, Ye C, Shi P, Zou X, Xiao R, Gong Y and Zhang Y, 2005. Independent origin of the growth hormone gene family in New World monkeys and Old World monkeys/hominoids. *J. Mol. Endocrinol.* 35: 399 - 409.

Liu JC, Makova KD, Adkins RM, Gibson S and Li WH, 2001. Episodic Evolution of Growth Hormone in Primates and Emergence of the Species Specificity of Human Growth Hormone Receptor. *Mol. Biol. Evol.* 18: 945 - 953.

MacLeod JN, Worsley I, Ray J, Friesen HG, Liebhaber SA and Cooke NE, 1991. Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology* 128(3):1298-302

Masuda N, Watahiki M, Tanaka M, Yamakawa M, Shimizu K, Nagai J and Nakashima K, 1988. Molecular cloning of cDNA encoding 20 kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 949(1): 125-31.

Morikawa M, Green H and Lewis UJ, 1984. Activity of human growth hormone and related polypeptides on the adipose conversion of 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 4: 228 - 231.

Nachtigal MW, Nickel BE and Cattini PA, 1993. Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. A possible mechanism for locus regulation. *J. Biol. Chem.* 268: 8473 - 8479.

Nial HD, Hogan ML and Saver R, 1971. Sequence of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: Evaluation from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66: 866-870.

Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O and Lindahl A, 1992. Growth Hormone Induces Multiplication of the Slowly Cycling Germinal Cells of the Rat Tibial Growth Plate. *PNAS* 89: 9826 - 9830.

Osafo J, Wei Y, Kenth G and Goodyer CG, 2005. Growth hormone during development. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 6(3): 173-82.

Pairault J and Lasnier F, 1987. Dihydrocytochalasin B promotes adipose conversion of 3T3 cells. *Biol. Cell* 61(3): 149-54.

Pérez A, tesis de Maestría, 2008. Genómica comparativa de los *loci* GHs del mono rhesus y chimpancé.

Peterson FC and Brooks CL, 1997. Identification of a Motif Associated with the Lactogenic Actions of Human Growth Hormone. *J. Biol. Chem.* 272: 21444.

Raben MS, 1957. Preparation of Growth Hormone from Pituitaries of Man and Monkey. *Science* 125: 883 - 884.

Ramirez R, Resendez D, Alvidrez LE, Rincon DE, Varela R, Martinez HG and Barrera-Saldana HA, 1990. New vectors for the efficient expression of mammalian genes in cultured cells. *Gene* 87(2): 291-4.

Ramírez JL, Castro F y Kuri W, 1992. Quantitation of adipose conversión and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*. 97:493-497.

Ray J, Jones BK, Liebhaber SA and Cooke NE, 1989. Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology* 125:566-568.

Reséndez D, Ramírez R, Varela A, Martínez HG and Barrera-Saldana HA, 1990. Coding potential of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic. Acids. Res.* 18: 4665 - 4670.

Revol A, Esquivel D, Martinez I and Barrera-Saldana HA, 2004. Expansion and divergence of the GH locus between spider monkey and chimpanzee. *Gene* 336(2): 185-93.

Rincón DE, Resendez D, Ortiz R, Alvidrez LE, Castro F, Kuri W, Martinez HG and Barrera-Saldana HA, 1993. HGH isoforms: cDNA expression, adipogenic activity and production in cell culture. *Biochim Biophys Acta* 1172(1-2): 49-54.

Rubin DA and Dores RM, 1994. Cloning of a growth hormone from a primitive bony fish and its phylogenetic relationships. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95(1): 71-83.

Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C and Ailhaud G, 2004. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315(2): 255-63.

Sambrook J, R W D, 2001. *Molecular Cloning A LaboratoryManuaal*. Cold Spring Harbor, New York.

Somers W, Ultsch M, De-Vos AM and Kossiakoff AA, 1994. The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature* 372(6505): 478-81.

Souza SC, Frick GP, Wang X, Kopchick JJ, Lobo RB and Goodman HM, 1995. A Single Arginine Residue Determines Species Specificity of the Human Growth Hormone Receptor. *PNAS* 92: 959 - 963.

Spiegelman BM and Farmer SR. 1982. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* 29(1):53–60.

Strasburger CJ, Wu Z, Pflaum CD, and Dressendorfer RA, 1996. Immunofunctional assay

of human growth hormone (hGH) in serum: a possible consensus for quantitative hGH measurement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 2613 - 2620.

Todaro GJ and Green H, 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17: 299.

Too CK, Murphy PR and Friesen HG, 1989. G-proteins modulate prolactin- and interleukin-2-stimulated mitogenesis in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 124: 2185.

Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera HA, Resendez D and Saunders GF, 1991. The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr. Rev.* 12: 316 – 328.

Wallis M, 1996. The molecular evolution of vertebrate growth hormones: a pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change. *J. Mol. Evol.* 43(2): 93-100.

Wallis OC and Wallis M, 2002. Characterisation of the GH gene cluster in a new-world monkey, the marmoset (*Callithrix jacchus*). *J. Mol. Endocrinol.* 29: 89 - 97.

Wallis OC and Wallis M, 2006. Evolution of growth hormone in primates: the GH gene clusters of the New World monkeys marmoset (*Callithrix jacchus*) and white-fronted capuchin (*Cebus albifrons*). *J. Mol. Evol.* 63(5): 591-601.

Waters MJ, Hoang HN, Fairlie DP, Pelekanos RA and Brown RJ, 2006. New insights into growth hormone action. *J. Mol. Endocrinol.* 36: 1 - 7.

Ye C, Li Y, Shi P and Zhang YP, 2005. Molecular evolution of growth hormone gene family in old world monkeys and hominoids. *Gene* 350(2): 183-92.

CAPÍTULO X

ANEXOS

Anexo 1: Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1 Hygro+.

Anexo 2: Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-hGH-N.

Anexo 3: Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del chimpancé.

Anexo 4: Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del gorila.

Anexo 5: Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del mono rhesus.

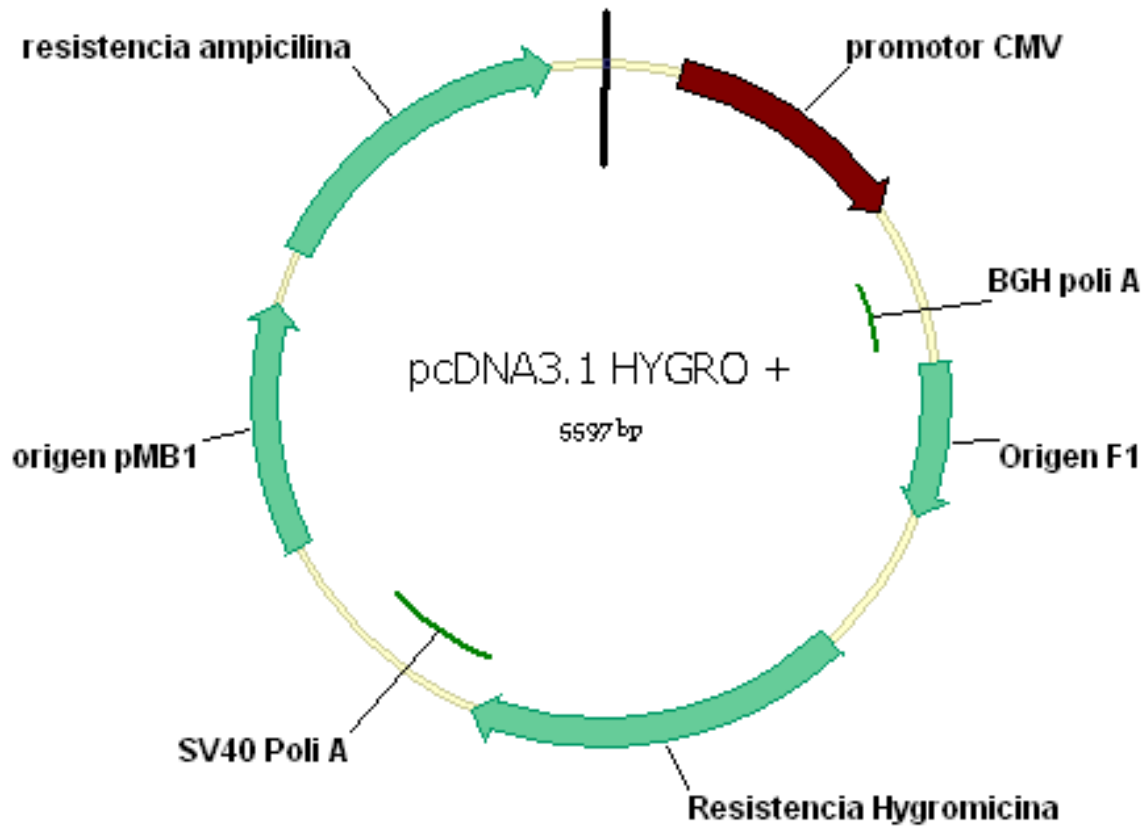
Anexo 6: Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del mono araña.

Anexo 7: Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del lémur.

Anexo 8: Caracterización enzimática de los vectores de expresión pcDNA3.1-GH-N

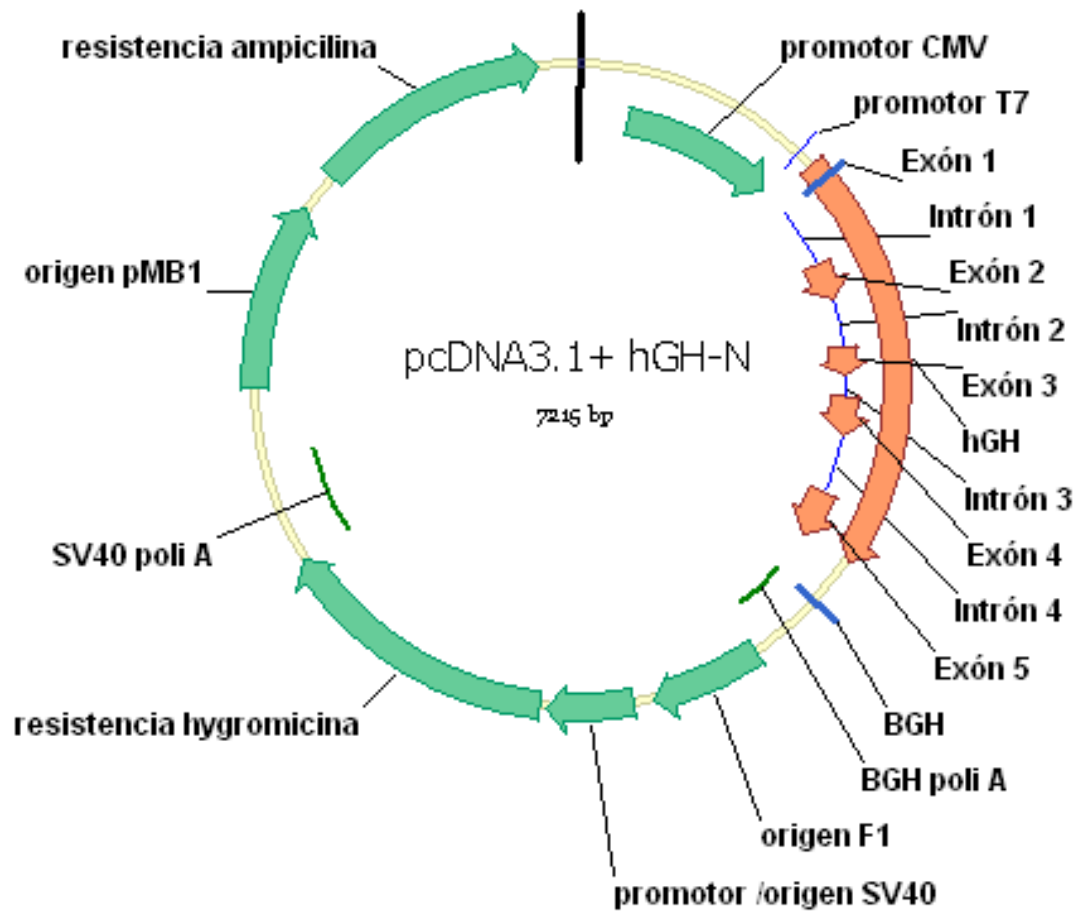
Anexo 1

Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1 Hygro+ .



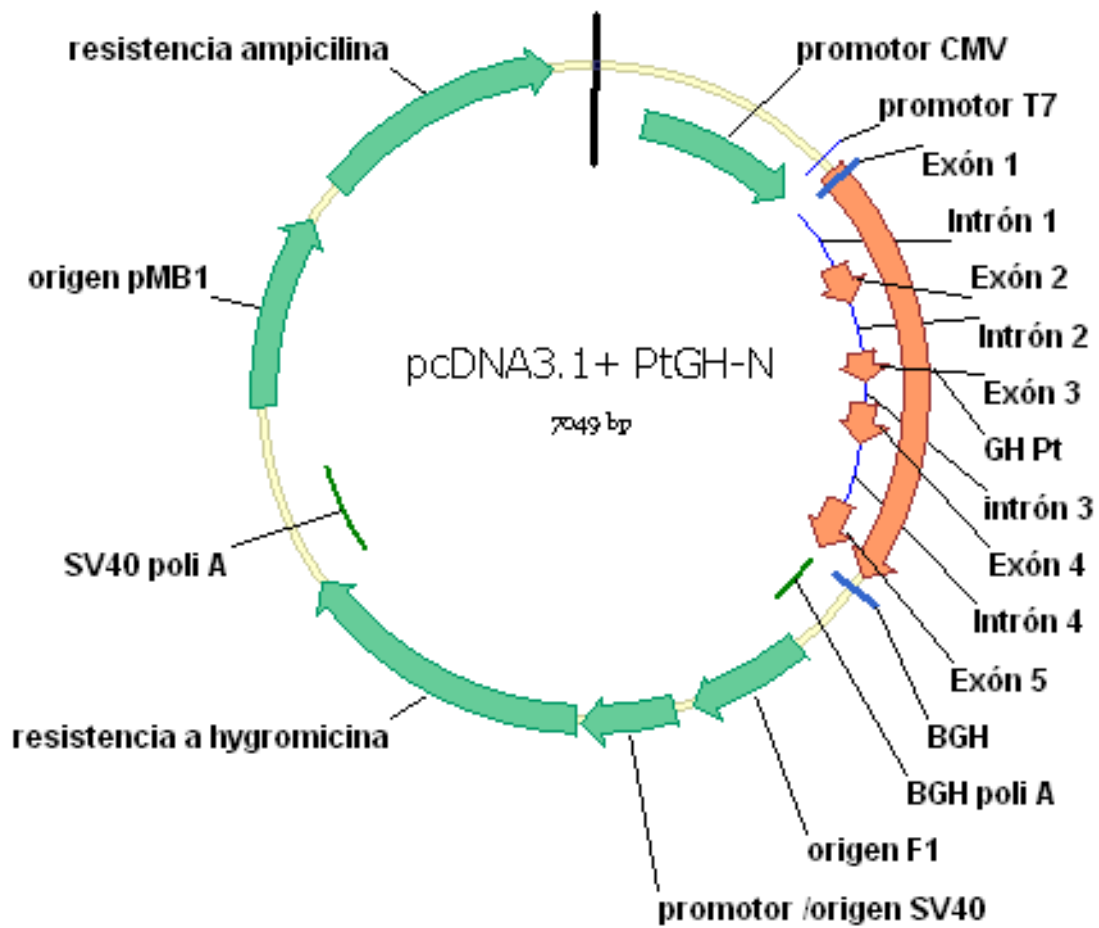
Anexo 2

Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-hGH-N.



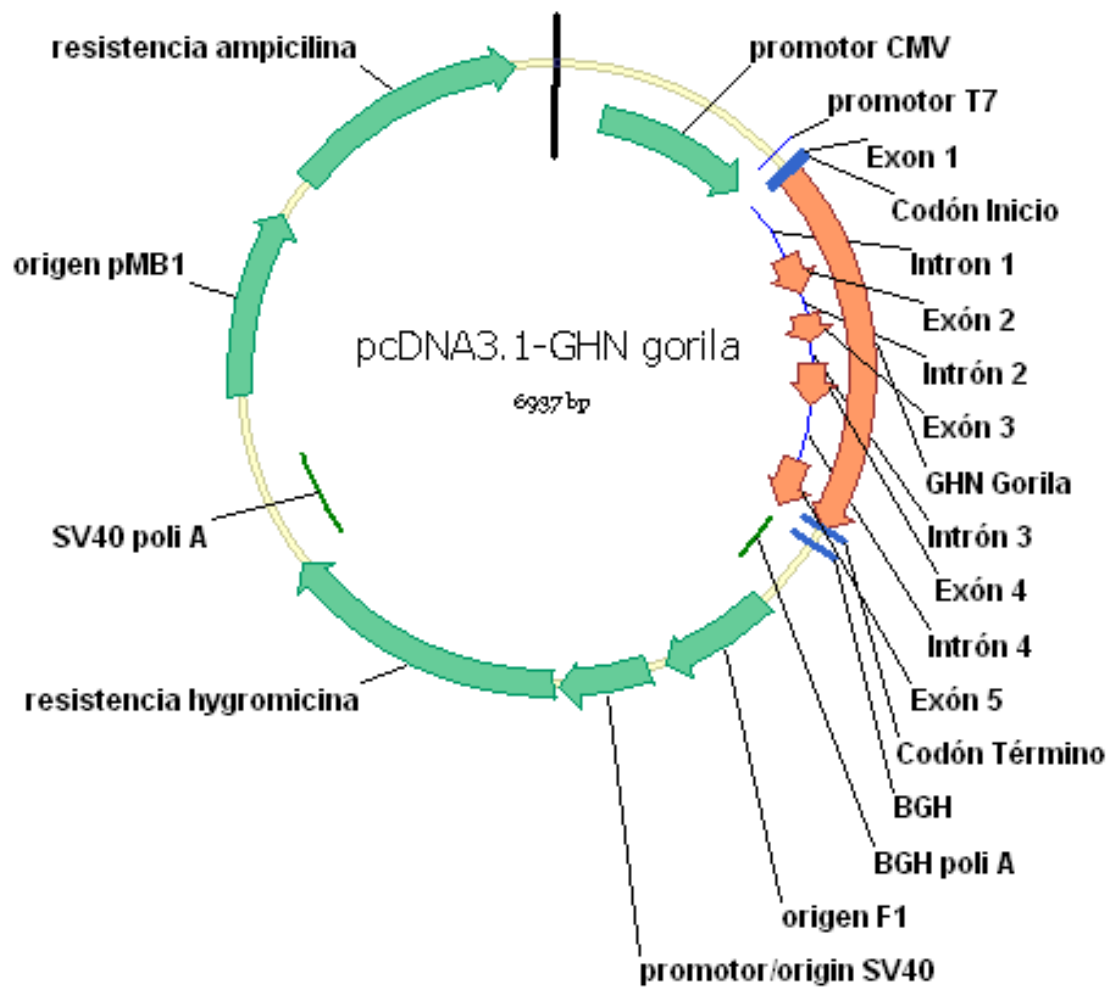
Anexo 3

Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del chimpancé.



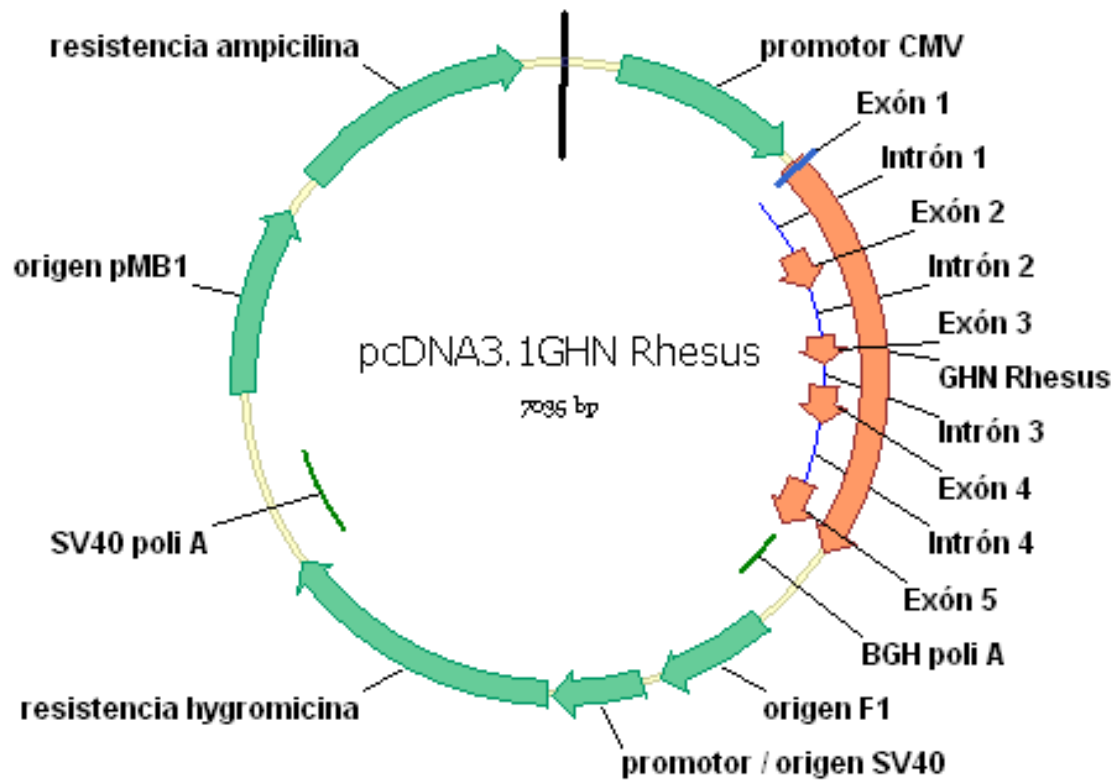
Anexo 4

Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del gorila.



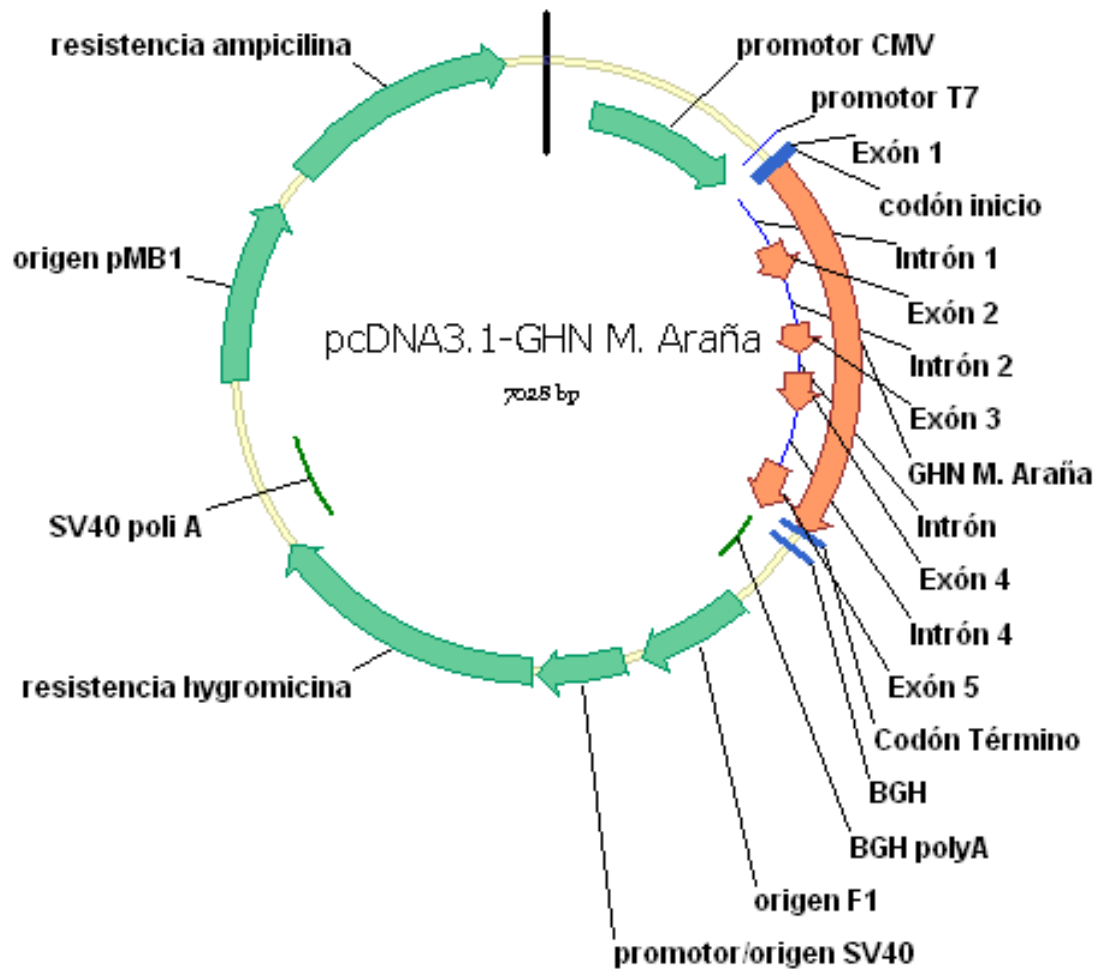
Anexo 5

Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del mono rhesus.



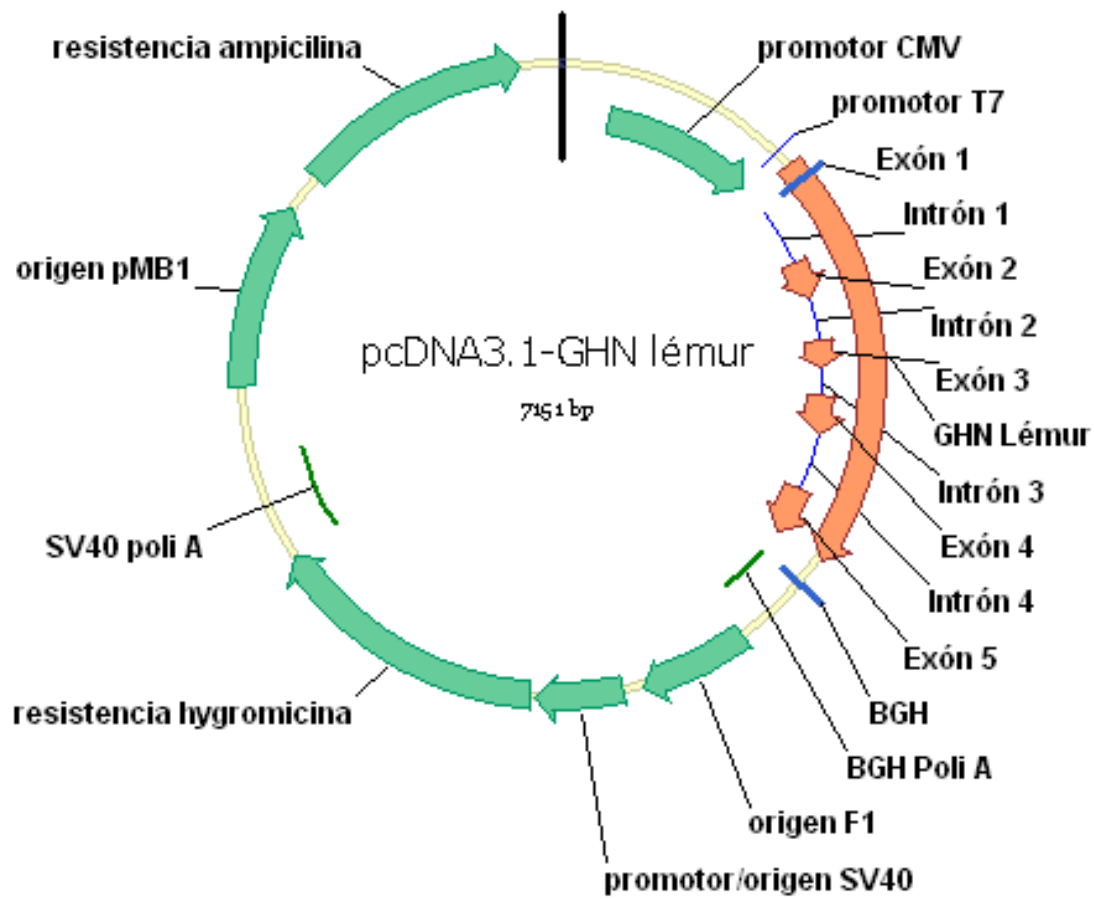
Anexo 6

Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del mono araña.

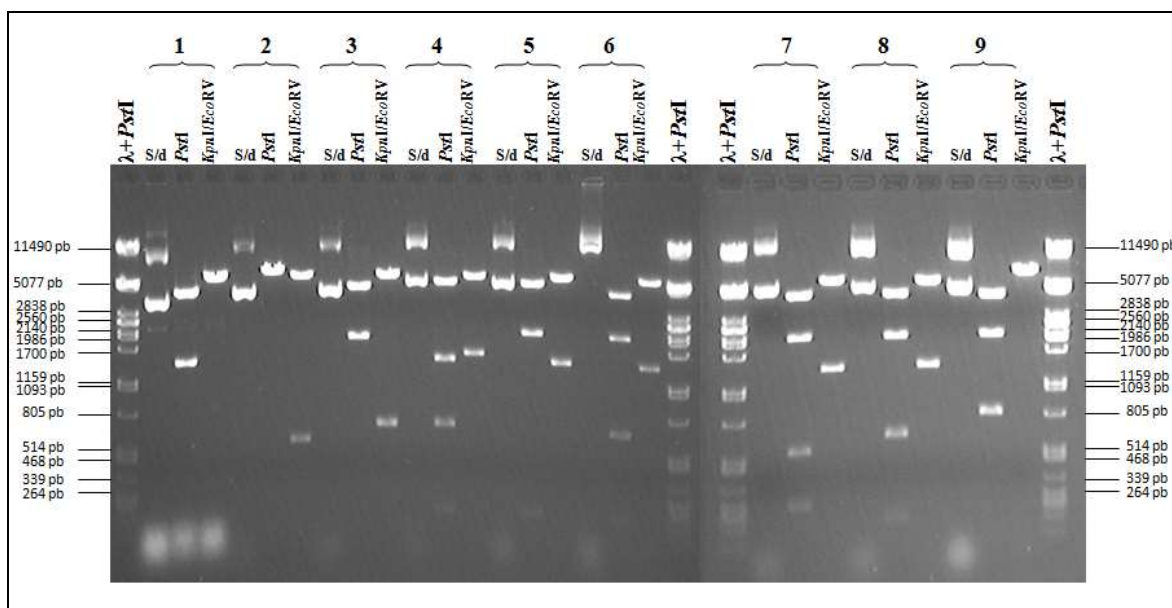


Anexo 7

Mapa gráfico del vector de expresión pcDNA3.1-GH-N del lémur.



Anexo 8: Caracterización enzimática de los vectores de expresión pcDNA3.1-GH-N



Los números superiores indican la muestra analizada por restricción: pcDNA3.1H+ (1), hGH 20kDa (2), hGH 22 kDa (3), humano (4), chimpancé (5), gorila (6), mono rhesus (7), mono araña (8), y lémur(9); (s/d) vector sin digerir. Como marcador de peso molecular se empleó al DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima *Pst*I.

Especie	pcDNA3.1H+		Humano		Chimpancé		Gorila		M. Rhesus		M. Araña		Lémur	
Nº carril	1		4		5		6		7		8		9	
Enzimas	PstI	*	PstI	*	PstI	*	PstI	*	PstI	*	PstI	*	PstI	*
Fragmentos (pb)	4103	5554	4815	5554	4771	5555	4095	5554	4095	5554	4082	5554	4143	7151
	1494	43	1494	1661	2111	1494	2111	1383	2110	1474	2112	1481	2165	
			739		167		562		658		673		843	
			167				169		165		168			

(*) Mezcla de enzimas *Kpn*I + *Eco*RV.